

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE



Scuola di Dottorato in Metodologie innovative applicate a malattie trasmissibili e cronico-degenerative: epidemiologia, statistica, prevenzione, management e nursing.

Indirizzo: Epidemiologia e profilassi di malattie prevenibili con vaccinazione (XXX ciclo)

Direttore: Professore Claudio Viscoli

“Studio I-MOVE +: stima dell’efficacia vaccinale sul campo del vaccino antinfluenzale nel prevenire le Sindromi respiratorie acute gravi da influenza confermata in soggetti ultra-sessantacinquenni ospedalizzati nelle stagioni influenzali 2015/2016 e 2016/2017”

Relatore: Chiar.mo Prof. Giancarlo Icardi

Dott.ssa Claudia Arcuri

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

1. INTRODUZIONE

2. CARATTERISTICHE DEL VIRUS INFLUENZALE

- 2.1 Struttura e morfologia
- 2.2 Genoma virale
- 2.3 Replicazione
- 2.4 Classificazione e Nomenclatura
- 2.5 Variabilità virale
- 2.6 Antigenic *Shift*
- 2.7 Antigenic *drift*

3. INFLUENZA UMANA EZIOLOGIA E PATOGENESI

- 3.1 Trasmissione
- 3.2 Replicazione ed eliminazione
- 3.3 Caratteristiche cliniche nell'adulto
- 3.4 Complicanze respiratorie dell'influenza
- 3.5 Fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze

4. SORVEGLIANZA VIROLOGICA

- 4.1 Diagnosi dell'Influenza
- 4.2 Sorveglianza Virologica durante la stagione 2015/2016 e 2016/2017

5. SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

- 5.1 Epidemiologia dell'influenza
- 5.2 Sorveglianza epidemiologica durante la stagione 2015/2016 e 2016/2017

6. LA VACCINAZIONE ANTINFLUENZALE

- 6.1 Vaccino con virus inattivato
 - a. Vaccino split
 - b. Vaccino a subunità

6.2 Vaccino con virus vivo attenuato

6.3 Vaccini adiuvati

- a. Sali di alluminio
- b. Emulsioni Acqua-Olio
- c. Emulsioni Olio-in-Acqua
- d. Liposomi
- e. Virosomi

6.4 Vaccino Intradermico

7. IL PROGETTO I-MOVE PLUS

8. OBIETTIVO DELLO STUDIO

8.1 Metodi

8.1.1 Disegno dello studio

8.1.2 Centri partecipanti

8.1.3 Popolazione in studio

8.1.4 Esposizione (vaccinazione)

8.1.5 Fattori di confondimento e modificatori di effetto

9. TEST DI LABORATORIO

9.1 Estrazione degli acidi nucleici ed amplificazione tramite PCR

10. RISULTATI

11. CONCLUSIONI

12. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

Il virus influenzale è l'agente eziologico di una patologia delle alte e delle basse vie respiratorie, ad andamento epidemico, con un notevole impatto sulla salute a livello mondiale. Si definisce influenza stagionale la malattia causata da virus influenzali già presenti sulla scena epidemiologica che, nei Paesi delle fasce temperate, circolano maggiormente nella stagione invernale fino a causare epidemie più o meno estese. Attualmente i virus responsabili delle epidemie stagionali sono i sottotipi A/H3N2, A/H1N1 e il tipo B garantendo la loro sopravvivenza nella popolazione trasmettendosi da uomo a uomo in modo pressoché continuo.

Le epidemie annuali sembrano interessare annualmente fra il 5 e il 15% della popolazione mondiale determinando tra i 250 e i 500 mila morti [1].

Con l'avanzare dell'età, nei soggetti con un'età maggiore ai 65 anni, l'organismo diventa progressivamente meno efficiente nel contrastare i virus influenzali, che hanno quindi maggiori possibilità di moltiplicarsi e fare danni. Il quadro clinico, poi, può essere ulteriormente peggiorato da infezioni respiratorie di origine batterica, che si sviluppano più facilmente nell'anziano già indebolito. Questo maggior rischio di base, che interessa anche anziani complessivamente sani, diventa particolarmente elevato quando l'influenza va a sommarsi ad altre patologie croniche, soprattutto di tipo respiratorio (come asma o broncopneumopatia cronica ostruttiva), cardiovascolare (coronaropatie, aterosclerosi, storia di infarto miocardico, ecc.) o metabolico (in particolare, il diabete). [2]

In questo contesto, la sorveglianza virologica attiva dei pazienti, condotta mediante l'uso di test di biologia molecolare specifici e sensibili, acquisisce una notevole importanza, consentendo il rilevamento tempestivo e la caratterizzazione dei microrganismi responsabili di *Influenza-Like Illness* (ILI), *Low Respiratory Tract Infections* (LRTI) e in generale di *Severe Acute Respiratory Infection* (SARI) e permette lo svolgimento di una diagnosi differenziale. [3, 4, 5, 6]; la vaccinazione antinfluenzale viene universalmente considerata lo strumento principale per la prevenzione dell'influenza [7]

Durante la replicazione nell'uomo i virus influenzali subiscono mutazioni puntiformi del genoma. Quando le mutazioni interessano i geni che codificano la sintesi di aminoacidi dei siti antigenici dell'emoagglutinina e della neuraminidasi, le due glicoproteine di superficie, il virus subisce un *drift* antigenico che gli consente di sfuggire alle difese immunitarie sviluppate dagli individui a seguito dell'infezione o della vaccinazione con varianti precedenti [11].

Emoagglutinina e neuroaminidasi giocano un ruolo cruciale nel determinare le caratteristiche antigeniche del virus e nell'elicitazione della risposta immune cellulare ed umorale. Cambiamenti aminoacidici sui siti antigenici dell'emoagglutinina, brevi sequenze di aminoacidi riconosciute essere il target degli anticorpi, determinano la comparsa di nuovi pattern antigenici del virus [12].

Una delle conseguenze del *drift* antigenico è la necessità di aggiornare annualmente la composizione del vaccino sulla base dei dati raccolti dal sistema di sorveglianza globale nel corso della precedente stagione influenzale [13].

L'efficacia della vaccinazione annuale dipende dal *match* fra gli strains vaccinali e i ceppi virali circolanti [14]. Il vaccino contro i virus influenzali elicitava una risposta immune che dovrebbe essere efficace sia contro gli strains virali contenuti nel vaccino che contro strains virali antigenicamente differenti, come le varianti driftate, che possono comparire successivamente alla raccomandazione annuale sulla composizione vaccinale (cross-protezione). Tuttavia le varianti driftate possono compromettere l'immunità indotta dal vaccino a causa del *mismatch* antigenico con i ceppi vaccinali, e il risultante tasso di sieroconversione (calcolato come titolo del test di inibizione dell'emagglutinazione, HAI, ≥ 40 Unità Internazionali) varia in accordo con la distanza antigenica tra i ceppi contenuti nel vaccino e quelli circolanti [15-17].

Differenti strategie sono state proposte per ottenere una maggiore protezione nei confronti delle varianti driftate e non del virus influenzale fra cui l'utilizzo di vaccini adiuvati e di diverse vie di somministrazione (vaccinazione intradermica) in grado di aumentare la risposta immune locale e sistemica agli antigeni vaccinali [11, 18]

In particolare i vaccini adiuvati con MF59 e il nuovo vaccino intradermico hanno mostrato di elicitare una maggiore risposta anticorpale nei confronti dei virus vaccinali e delle varianti eterologhe driftate, rispetto ai vaccini split o a sub unità.[18,19]

La vaccinazione anti-influenzale è senza dubbio raccomandata per l'ultra-sessantacinquenne. Essa è in grado di ridurre complicanze, ospedalizzazioni e morti dovute a tale infezione, e deve essere effettuata ad ogni stagione autunnale (periodo ottobre-dicembre). Il calo registrato negli ultimi anni nelle coperture per tale vaccinazione, imputabile soprattutto a crisi comunicative su presunte problematiche di sicurezza poi rivelatesi infondate, deve spingere a rinnovato impegno nel promuovere tale intervento preventivo, spiegando i reali rischi della vaccinazione e il pericolo rappresentato dalla mancata adesione all'offerta di immunizzazione stagionale.[20]

2. CARATTERISTICHE DEL VIRUS INFLUENZALE

2.1. Struttura e morfologia

Il virus influenzale è un virus ad RNA appartenente alla famiglia degli *Orthomyxoviridea*. Al microscopio elettronico (**Figure 1, 2**) il virus si presenta come una particella sferica, o filamentosa, di 80-120 nm di diametro, con struttura complessa [21].

I segmenti di RNA dei virus influenzali sono incapsulati indipendentemente nella nucleoproteina virale e ogni segmento è associato con un complesso polimerasico. La particella subvirale comprendente l'RNA virale (vRNA), la nucleoproteina e il complesso polimerasico viene chiamata ribonucleoproteina (RNP) [22].

Le ribonucleoproteine si trovano all'interno di un involucro formato dalla proteina M1 che circonda la membrana lipidica virale che si forma dalla membrana plasmatica della cellula infettata nel corso del processo di gemmazione [22].

Immerse nella membrana virale si trovano tre proteine: due glicoproteine *spikes*, la Neuroaminidasi (NA) e l'Emagglutinina (HA), che al microscopio elettronico appaiono come 400-500 proiezioni dirette verso l'esterno dell'involucro virale, e una proteina con funzioni di canale di membrana (M2) [22].



Figura 1. Il virus influenzale visto al microscopio elettronico a scansione: sono evidenti gli spikes che rappresentano le porzioni proteiche neuraminidasi e emagglutinina.

Neuroaminidasi ed emagglutinina, che si distribuiscono sulla superficie virale con un rapporto di 8:1, rappresentano le strutture antigeniche più importanti del virus.

La Neuroaminidasi è una proteina tetramERICA costituita da 4 subunità identiche: possiede una porzione idrofobica che permette il suo ancoraggio alla membrana virale e una testa globulare idrofila contenente il sito attivo che esplica la funzione enzimatica e i siti antigenici della molecola.

L'azione enzimatica della neuroaminidasi si esplica attraverso il clivaggio del ponte sialico tra l'acido acetilneuraminico e la D-galattosamina o il D-galattosio presenti sulla superficie delle emazie, riducendo così il fenomeno di agglutinazione dei globuli rossi in una fase temporanea [23].

L'emagglutinina è costituita da due catene distinte, HA1 e HA2, che originano da HA0 tramite processi di natura proteolitica. Le due catene sono legate in maniera covalente da un ponte disolfuro fra la posizione 14 di HA1 e la posizione 137 di HA2.

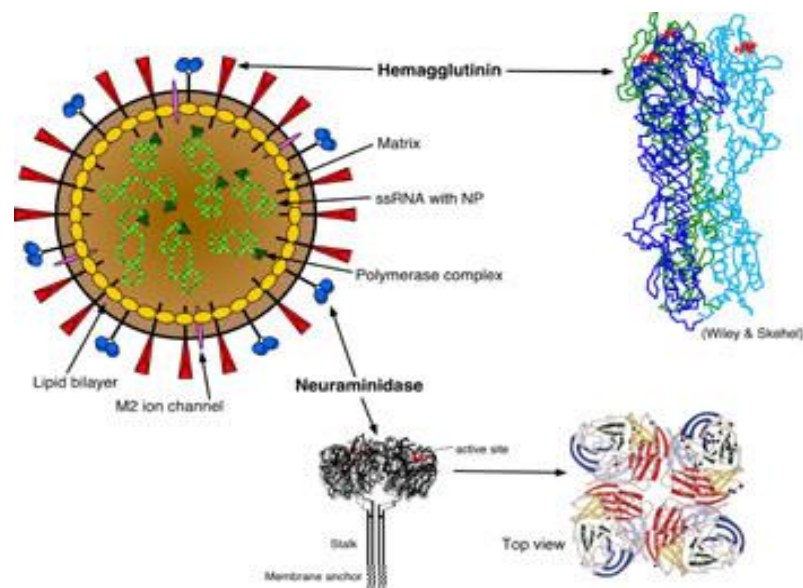


Figura 2. *Rappresentazione schematica della struttura virale e delle proteine di superficie.*

L'emagglutinina (**Figura 3**) è una glicoproteina di membrana con una porzione N-terminale idrofila che ha funzione di sequenza segnale, una porzione C-terminale idrofobica che la ancora alla membrana virale e un breve dominio intracitoplasmatico. La molecola sembra avere un dominio globulare localizzato alla testa di una regione elongata della porzione lineare. La regione globulare contiene solo una parte di HA1 mentre l'altra

parte di HA1 e l'intera catena HA2 compongono la porzione lineare. In una tasca della regione globulare si trova il sito di legame recettoriale attraverso il quale il virus si lega all'acido sialico della membrana cellulare dell'ospite. Il sito recettoriale è composto lateralmente da catene aminoacidiche altamente conservate nei differenti strain virali. Altri residui conservati sono localizzati posteriormente la tasca e sembrano stabilizzare la struttura del sito senza interagire col recettore. Il perimetro della superficie della tasca è invece composto da residui aminoacidici che vanno incontro a mutazioni nel caso di drift antigenico. Le mutazioni interessano prevalentemente cinque regioni della testa globulare chiamate A, B, C, D ed E che è stato dimostrato essere i siti di legame per gli anticorpi [24].

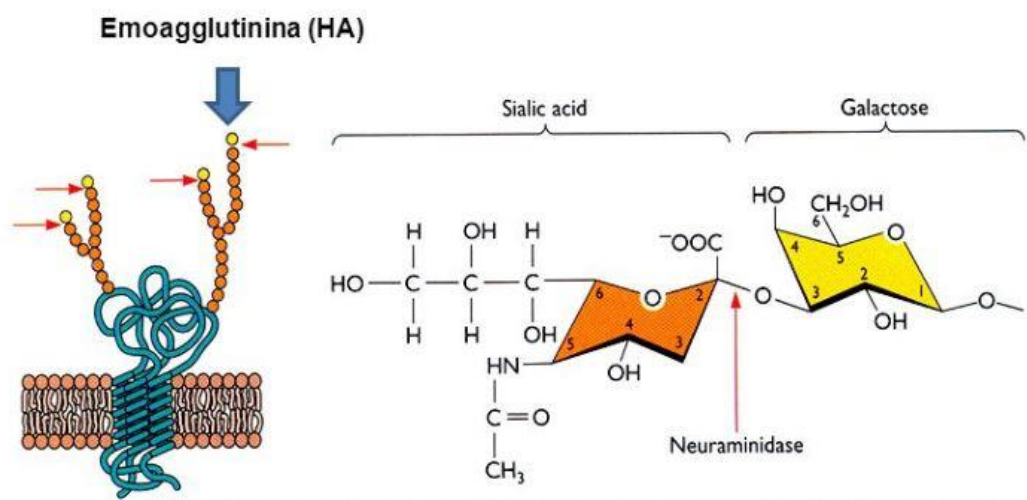


Figura 3. *Struttura dell'emagglutinina*

L'emagglutinina è coinvolta nel processo di fusione virale con l'endocita, e costituisce il sito di legame per le emazie e per il recettore cellulare presente sulla superficie delle cellule ospite; gli anticorpi specifici diretti contro l'emagglutinina inibiscono il fenomeno di emagglutinazione dei globuli rossi così come l'infezione delle cellule bersaglio da parte del virus influenzale [25]. Altri elementi fondamentali dell'intera molecola virale sono: la proteina M1, costituente principale della matrice di membrana e la proteina M2, canale ionico posto tra gli *spikes* nel doppio strato lipidico, che gioca un ruolo importantissimo nella dissociazione/destabilizzazione dello strato lipidico necessaria per la definitiva entrata del virus nella cellula bersaglio. La proteina NS, non ha funzione strutturale, ma è un elemento indispensabile per la replicazione virale [22].

2.2. Genoma virale

Il genoma virale è costituito da RNA a singolo filamento, di polarità negativa (complementare quindi all'mRNA) e segmentato. Il genoma dei virus A e B è costituito da 8 segmenti mentre quello del virus C da 7 segmenti. La maggior parte dei segmenti codifica per un singolo prodotto genico. (**Figura 4**)

I tre geni più lunghi (segmenti 1, 2 e 3) codificano, nel virus A dell'influenza, per i componenti dell'RNA polimerasi, PB1, PB2, e PA e per i loro equivalenti nei virus B e C.

Il segmento 4 (in termini di lunghezza) codifica per l'emagglutinina dei virus A e B e per la proteina di fusione emagglutinina-estesi (HEF) del virus C che possiede sia le attività di fusione con la membrana e sito di legame dell'emagglutinina che l'attività di distruzione del recettore della neuroaminidasi.

Il segmento 5 codifica la nucleoproteina (NP), il componente strutturale più importante associato all'RNA virale a formare la ribonucleoproteina (RNP).

Il segmento 6 dei virus A e B codifica la neuroaminidasi, mentre non esiste un segmento equivalente nel virus C.

I due segmenti più corti dei virus A e B (segmenti 7 e 8) e del virus C (segmenti 6 e 7) codificano per le proteine M (1 e 2) e le proteine non strutturali NS (1 e 2) [26,27].

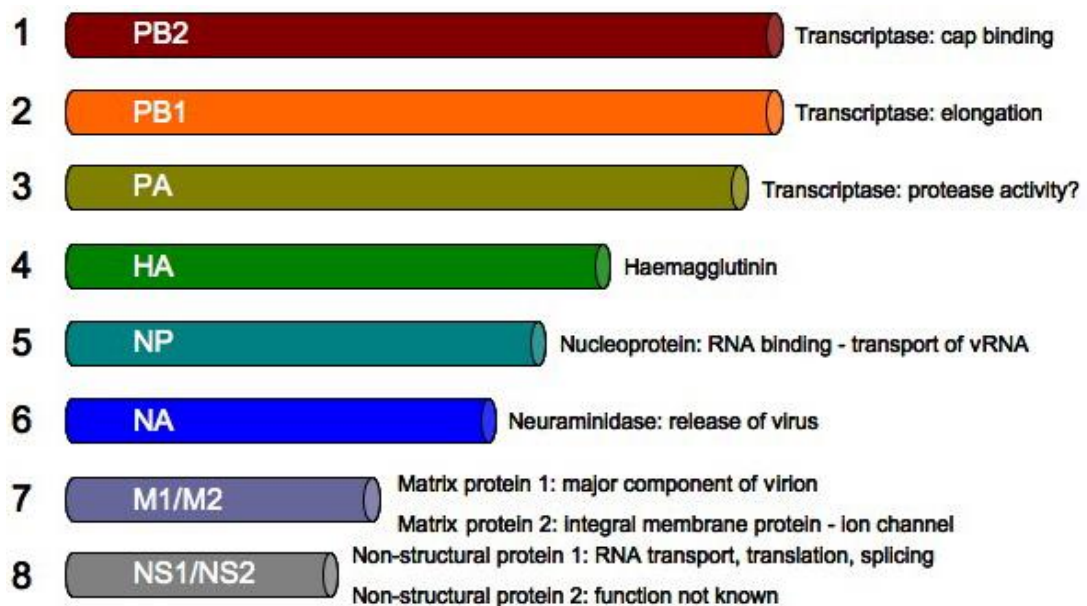


Figura 4. Rappresentazione schematica degli otto segmenti del genoma virale e le relative proteine codificate.

2.3. Replicazione

Dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite, mediato dal legame fra le glicoproteine virali di membrana e le glicoproteine contenenti acido sialico e i recettori per i glicolipidi sulla superficie cellulari, le ribonucleoproteine virali attive penetrano nel nucleo della cellula infettata per iniziare l'espressione e la replicazione del genoma virale.

La trascrizione primaria del genoma virale in mRNA è catalizzata dall'RNA polimerasi virale complessata con le ribonucleoproteine virali infettanti.

Il complesso trascrizionale del virus A consiste di una polimerasi trimerica comprendente le proteine PB1, PB2 e PA.

La componente PB1 è una trascrittasi per se che catalizza l'addizione di nucleotidi nell'iniziazione e nell'elongazione del trascritto di RNA.

La componente PB2 è una endonucleasi cap-dipendente la cui funzione è di legare l'RNA incappucciato e di clivarlo per generare i primers per la sintesi dell'mRNA virale.

La componente PA è fondamentale per la replicazione dell'RNA virale ma il suo ruolo è ancora parzialmente sconosciuto.

Le ribonucleoproteine virali sono strutture super-avvolte nelle quali sia le terminazioni 5' che 3' degli RNA virali sono associate con un complesso polimerasico.

La replicazione del virus può avvenire solo successivamente alla sintesi delle proteine virali.

L'assemblaggio del complesso trascrizionale avviene nel nucleo dove i suoi componenti sono uniti a formare nucleocapsidi destinati a diventare le particelle progenitrici del virus. Il trasporto dal sito di sintesi nel citoplasma al nucleo è mediato da un segnale kariofilico contenuto in tutti i componenti del complesso.

Le proteine integrali di membrana dell'involucro virale, HA, NA, M2 e NB dei virus A e B, e HEF e CM2 del virus C, sono sintetizzate in associazione con il reticolo endoplasmatico e inserite nella membrana attraverso un meccanismo di riconoscimento particella-dipendente. Nel corso del trasporto verso la superficie apicale della cellula attraverso l'apparato di Golgi, le proteine vengono assemblate nella loro struttura multimerica e sono modificate con l'aggiunta di catene di carboidrati e gruppi di acidi grassi. **(Figura 5)**

L'assemblaggio del virus con la membrana plasmatica della cellule infettata avviene mediante un processo di gemmazione attraverso il quale RNP ed M1 acquisiscono un involucro derivato dalle regioni della membrana cellulare modificate per esporre quasi esclusivamente proteine virali di membrana [26-27].

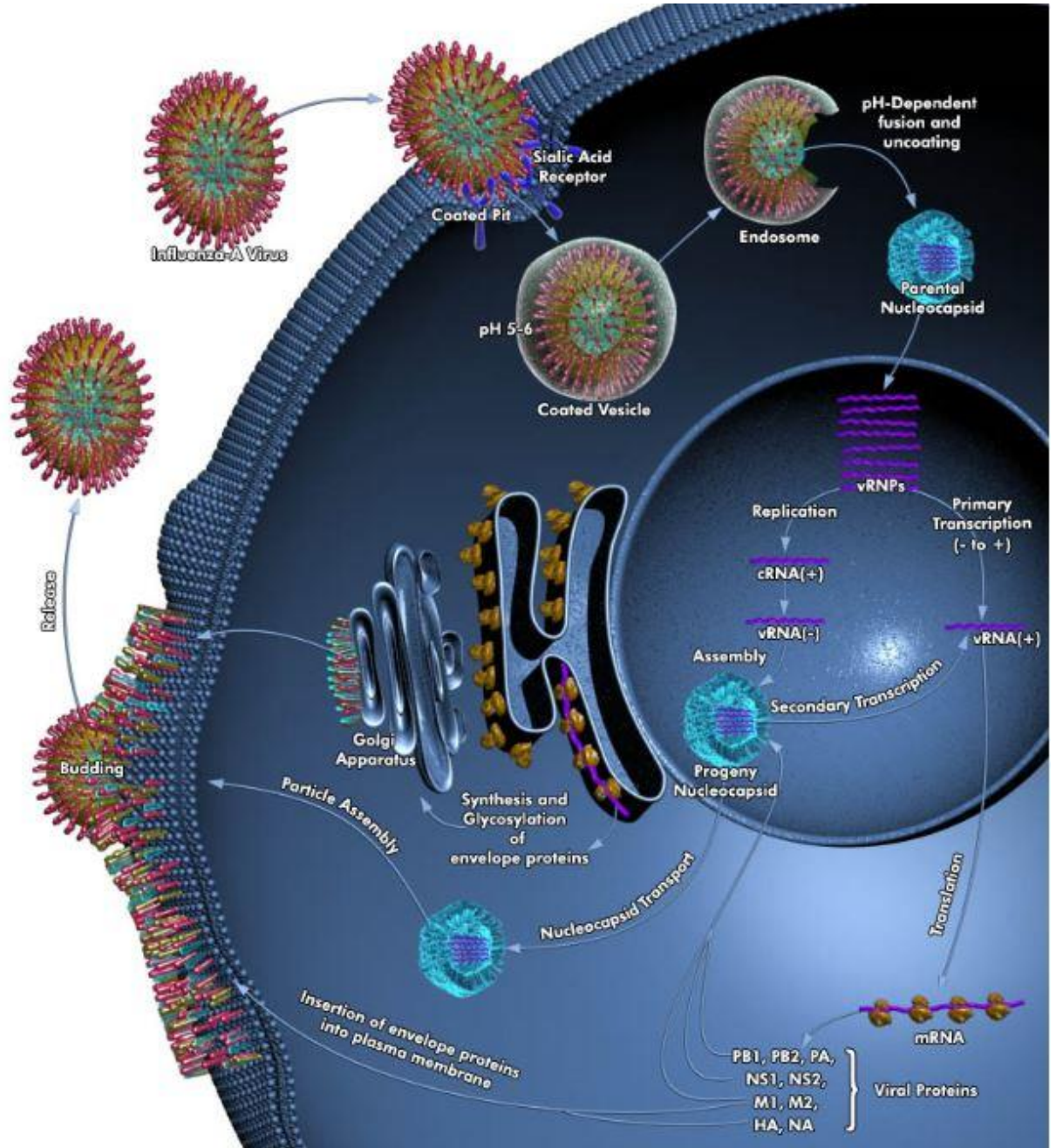


Figura 5. Ciclo di replicazione del virus dell'influenza

2.4. Classificazione e Nomenclatura

I virus influenzali sono classificati in tre tipi principali (A, B e C) sulla base delle proprietà antigeniche della nucleoproteina (NP) e delle proteine della matrice.

Il virus A e il virus B sono responsabili delle forme epidemiche di influenza mentre l'infezione da virus C decorre in maniera asintomatica assumendo minore importanza dal punto di vista clinico ed epidemiologico.

Il virus A, ampiamente diffuso in natura, circola sia nell'uomo che in altre specie ed è suddiviso in sottotipi in base alle differenti forme dell'emagglutina (HA) e della neuroaminidasi (NA). Fino ad oggi sono stati identificati 15 sottotipi di HA e 9 di NA. I virus B circolano solo nell'uomo e non esistono sottotipi da associare ad HA e NA.

I virus influenzali che vengono isolati sono identificati tramite una nomenclatura standard attraverso la quale viene indicato il tipo di virus, la locazione geografica dove è stato isolato per la prima volta, il numero sequenziale di isolamento, l'anno di isolamento e i sottotipi HA e NA (**Figura 6**). La continua comparsa di nuove epidemie di influenza è determinata dalla rapida evoluzione del genoma virale [22].

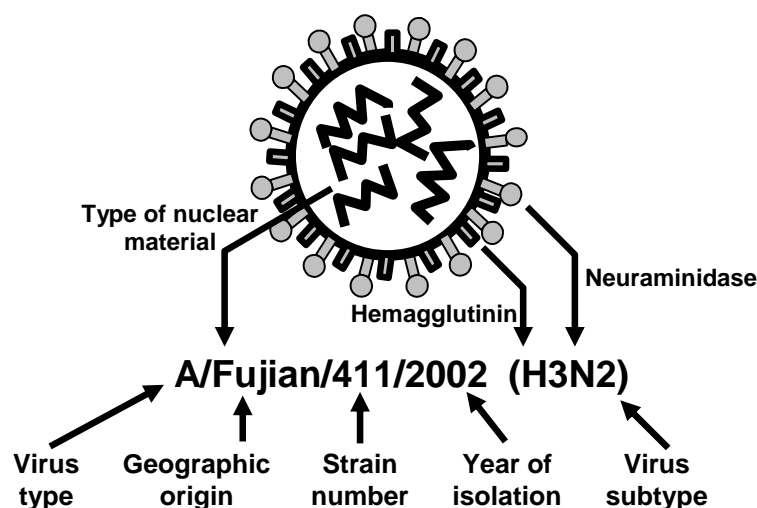


Figura 6. Diagramma della nomenclatura del virus influenzale in base alla *International Committee on Taxonomy of Viruses*

2.5 Variabilità Virale

L'andamento epidemiologico dell'influenza è caratterizzato dalla complessa interazione di molti fattori: virologici, demografici, ambientali e, più importante di tutti, la suscettibilità della popolazione nei confronti del virus. La "novità" antigenica del virus rispetto ai ceppi che hanno circolato nelle precedenti stagioni ha quindi un ruolo rilevante poiché il sistema immunitario di parte della popolazione risulta non essere in grado di fronteggiare il nuovo agente eziologico. Si possono riconoscere forme pandemiche (dovute al cosiddetto *antigenic shift*) ed interpandemiche (date da mutazioni minori o *antigenic drift*). Le prime sono riconducibili alla comparsa di un nuovo sottotipo del virus A, nei confronti del quale la popolazione è completamente suscettibile; in questo secolo abbiamo assistito a 3 pandemie: la spagnola nel 1918-1919 (provocata da un virus di tipo A/H1N1), l'asiatica nel 1957 (A/H2N2) e l'Hong Kong nel 1968 (A/H3N2). Mentre il virus A/H1N1 è stato introdotto direttamente da un serbatoio aviario senza riassortimento, i virus A/H2N2 A/H3N2 sono il risultato di quello che viene definito *antigenic shift* in cui solo tre o due dei geni aviari si sono sostituiti ai corrispondenti geni in ceppi virali umani. Le forme interpandemiche di influenza sono caratterizzate dalla diffusione di varianti minori dei virus A e B che differiscono nell'aspetto antigenico solamente in minima parte dai virus circolanti nella stagione precedente (*antigenic-drift*). La nuova variante caratterizzata dal *drift* ha, normalmente, diffusione più lenta ed ha un impatto sulla popolazione meno pesante rispetto alle varianti considerate potenzialmente pandemiche. La scadenza di questo fenomeno è ogni 2-4 anni per i virus A e 3-4 anni per il virus B.

2.6 Antigenic Shift

Lo *shift* antigenico è il meccanismo a cui fa seguito un radicale cambiamento delle strutture antigeniche di superficie del virus; ciò avviene in seguito a riassortimento genetico del virus ed è profondamente influenzato dalla biologia del microorganismo.

Il riassortimento genico, responsabile dell'evoluzione del microorganismo e della genesi di nuovi virus influenzali, si verifica molto rapidamente in un'infezione mista a causa della natura segmentata del genoma virale; tale fenomeno è stato osservato sia in vitro che in vivo, in particolare è stato dimostrato un riassortimento tra ceppi umani e suini e tra ceppi suini e aviari. [28,29]

Lo *shift* antigenico coinvolge solamente i virus influenzali di tipo A, mentre i virus di tipo B non possono andare incontro a *shift* antigenici poiché sono dotati di un unico tipo di HA e di NA e, a differenza dei virus A, non possiedono un *reservoir* aviario [28].

Il virus A trova infatti il suo *reservoir* naturale negli uccelli acquatici (anatre, oche, cigni, gabbiani, folaghe..) [30]; altri ospiti abituali sono polli, tacchini e quaglie. L'infezione da virus influenzale decorre, in questi animali, in modo del tutto asintomatico ad eccezione di alcune varianti caratterizzate da emoagglutinina (HA) di tipo 5 (H5) o di tipo 7 (H7), in grado di determinare epidemia con elevata letalità nei polli e nei tacchini [31]. Il virus, in questi animali, si replica a livello intestinale e viene eliminato ad elevata concentrazione nelle feci ($10^{8.7}$ dose infettante uova/gr) [32]. Lo *shedding* virale così massiccio nelle acque, habitat naturale di questi animali, è in grado di perpetrare una trasmissione feco-orale piuttosto efficiente: si stima, infatti, che il 30% delle oche selvatiche nuove nate, venga a contatto con il virus prima di partire per la prima migrazione [33]. Nelle specie acquatiche si assiste alla cocircolazione di più sottotipi contemporaneamente; il sottotipo predominante nelle varie specie varia da anno ad anno, dal continente e dal percorso seguito durante la migrazione (nelle oche selvatiche in Europa i sottotipi predominanti sono l'H1, l'H2 e l'H4 mentre nel Nord America l'H3, l'H4 e l'H5) [34]. La sorveglianza virologica ha permesso di individuare negli uccelli acquatici tutte le 15 HA ad oggi note, mentre ne sono state trovate 3 nell'uomo (H1, H2, H3), 2 nei suini (H1, H3) e 2 negli equini (H3, H7). L'importanza del *reservoir* aviario emerge dall'evidenza che gli uccelli acquatici giocano un ruolo centrale nella trasmissione interspecie del virus. Sembra accertato che virus aviari siano in grado di infettare polli, tacchini, suini [35], balene [36] e siano stati responsabili di epidemie negli equini [37]. Questa grande variabilità, unita al genoma segmentato del virus influenzale può portare, durante l'infezione delle cellule ospiti, ad un fenomeno importantissimo dal punto di vista immunologico e, di conseguenza, epidemiologico: il riassorbimento del materiale genetico, responsabile dell'evoluzione del microrganismo e della diffusione di nuovi virus influenzali. Di grande rilevanza, per le possibili conseguenze sull'uomo, è la trasmissione di virus aviari al maiale che può rappresentare il *mixing vessel* tra virus di origine aviaria e virus umani, permettendo la creazione di nuovi virus [38,39]. Il virus influenzale necessita infatti, a livello della cellula bersaglio, di un recettore costituito da una glicoproteina la cui parte glucidica termina con un legame Sia2-3Gal per i virus del clade aviario e Sia2-6Gal per i virus del *clade* umano. Le cellule target dei suini presentano entrambi i recettori e rendono così possibile la coinfezione e la stretta

“vicinanza” di virus aviari e umani. In queste condizioni la caratteristica organizzazione del genoma segmentato del virus influenzale permette che un singolo gene del virus aviario possa essere incorporato nel genoma di un virus umano, determinando la ricombinazione del materiale genetico del microorganismo. Questo meccanismo di riassortimento fra virus infettanti specie differenti sembra responsabile delle cosiddette variazioni maggiori o *antigenic shift* e sembra coinvolto nell’origine delle pandemie influenzali che si sono verificate nel secolo scorso.(Figura 7)

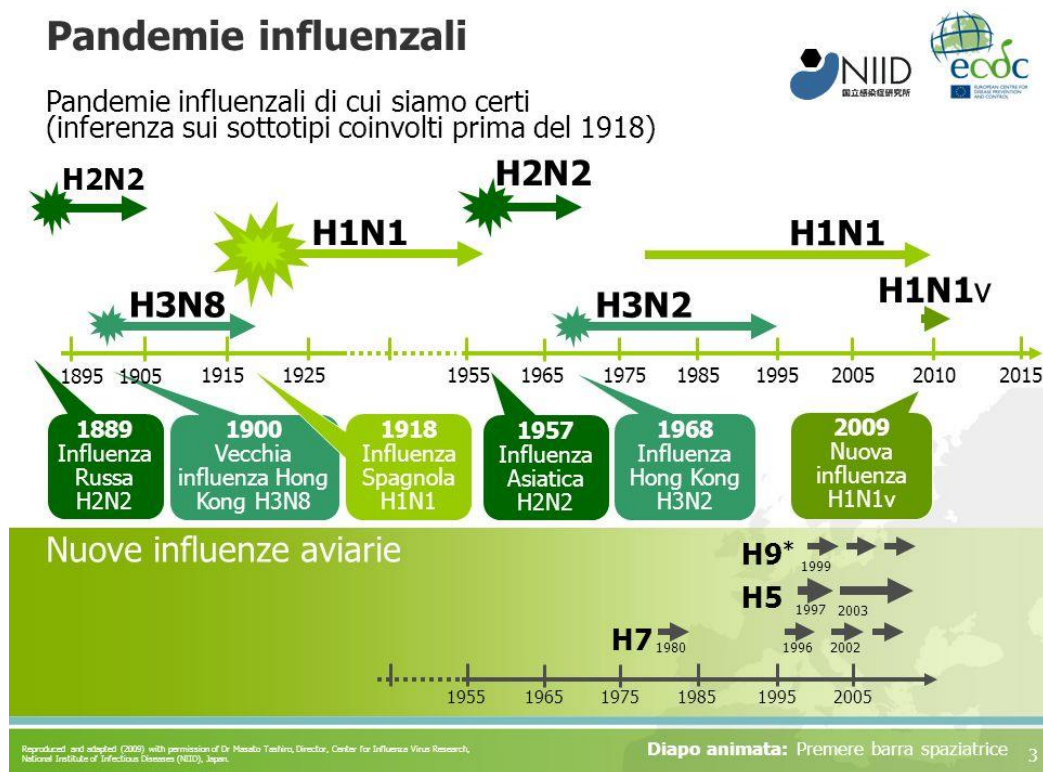


Figura 7. Cronologia delle varie varianti influenzali

La pandemia verificatasi nel 1957, la cosiddetta “asiatica”, è stata probabilmente originata dalla ricombinazione nel suino di un virus aviario circolante, di tipo A/H2N2, con un virus umano di tipo A/H1N1. Il virus risultante possedeva un corredo genetico caratterizzato da 3 geni di origine aviaria (HA, NA, PB1) e dai restanti 5 di origine umana. Il riassortimento, avendo coinvolto i geni codificanti l’emoagglutinina e la neuraminidasi, i determinanti antigenici di maggior rilievo, ha causato la comparsa di un virus verso cui l’intera popolazione era suscettibile creando così le condizioni necessarie per l’instaurarsi della pandemia. Analogo è il meccanismo che ha determinato la comparsa del virus influenzale responsabile della pandemia del 1968, la cosiddetta “Hong Kong”. Il virus emergente è stato il risultato della sostituzione dei 2 geni codificanti la

HA e la PB1 del virus umano circolante nelle stagioni precedenti con geni virali di origine aviaria [40].

Grande interesse continua a suscitare l'origine della pandemia denominata "Spagnola" sia per il notevole impatto avuto in termini di incidenza e mortalità, sia per l'inusuale elevata letalità che colpì le fasce d'età dei giovani adulti. Nella seconda metà degli anni '90, due gruppi di lavoro, il primo istituito dall' U.S. Armed Forces Institute of Pathology e un secondo gruppo anglosassone, si sono dedicati all'individuazione dell'origine e dell'evoluzione del virus responsabile della "Spagnola". Il gruppo americano ha isolato l'RNA virale da campioni biotici di polmone prelevati nel corso di biopsie effettuate nel 1918 su vittime della pandemia, mentre i ricercatori inglesi hanno individuato il virus in alcuni campioni di tessuto di minatori morti di influenza e sepolti alle Svalbard. Dai primi dati definitivi pubblicati sull'analisi di sequenza dell'HA è emerso come il virus appartenesse al *clade* dei mammiferi, seppur la sequenza si avvicinasse notevolmente a quella del *clade* aviario [41].

Importanti studi filogenetici effettuati sul virus influenzale H5N1, sottotipo aviario che circola dal 1997, hanno messo in luce la sua capacità di mutare rapidamente e acquisire geni da virus che infettano altre specie animali generando nuovi ceppi di influenza umana.

Il virus H5N1, dall'inizio del 2003, ha effettuato una serie di salti di specie, acquisendo la capacità di contagiare anche gatti, topi e l'uomo rappresentando così un emergente problema di salute pubblica [42].

E' stato infatti documentato, a partire dal 2003, che il virus aviario H5N1 è in grado di infettare anche gli esseri umani causando sindromi acute che possono portare nella maggior parte dei casi a morte; sono stati registrati, da novembre 2003, più di 700 casi di infezioni umane da H5N1 da 15 paesi in Asia, Africa, le zone del Pacifico, l'Europa e il Vicino Oriente. L' 8 Gennaio 2014 è stato documentato il primo caso di H5N1 nel continente Americano e più precisamente in Canada [43] (**Figura 8**)

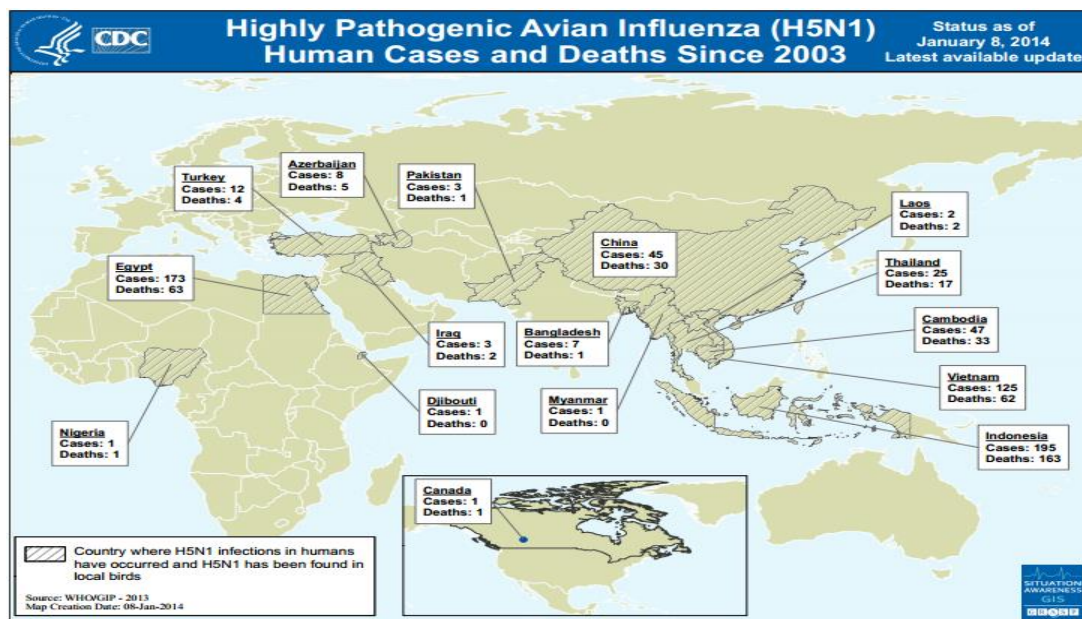


Figura 8. Situazione globale di casi e decessi umani correlati all' infezione da virus altamente patogenico Aviario A H5N1

Attualmente, il virus H5N1 non si trasmette in modo efficiente da persona a persona, i casi di influenza aviaria nell'uomo registrati nel corso degli ultimi anni si sono verificati a seguito del passaggio diretto da pollame infetto a uomo, nonostante alcuni casi di limitata e non sostenuta trasmissione da uomo a uomo si sono probabilmente verificati. In particolare, sono stati registrati 2 - 8 casi tutti appartenenti a cluster familiari, la cui diffusione si è verificata infatti dopo un lungo periodo di stretto contatto non protetto nella stessa casa o nella stessa stanza di ospedale con un membro della famiglia con legame di sangue (ad esempio madre-figlia o il fratello-fratello). [44]

Nel Marzo 2013, dalla Cina, è stato riportato il primo caso di infezione umana ad opera di un nuovo virus influenzale aviario di tipo A sottotipo (H7N9); i pazienti infetti hanno presentato gravi affezioni respiratorie e circa un terzo degli affetti è andato incontro a morte.

Durante la primavera del 2013, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha riportato 132 infezioni H7N9 umani, tra cui 44 morti. Non è stata mostrata alcuna evidenza di diffusione sostenuta da persona a persona del virus A H7N9, anche se alcune prove indicano, in rare circostanze, limitata diffusione da persona a persona.[45]

Come il virus aviario H5N1, anche il virus A H7N9 e i virus pandemici che circolarono nel 1957 e nel 1968 hanno avuto origine in Asia sud-orientale e questo desta considerevole interesse dato che porta alla formulazione dell'ipotesi secondo la quale, per le pratiche agricole della zona che portano a stretto contatto uomo, anatre e maiali, è alta la possibilità che si verifichi un' infezione mista tra le suddette specie.

Tuttavia, la preoccupazione è che questo virus H7N9, come accadde per i virus che hanno causato le pandemie influenzali del 1918, 1957 e nel 1968, potrebbe adattarsi scambiando segmenti genici con i virus dell' influenza umana durante una co- infezione dello stesso ospite e diventare di conseguenza un nuovo virus trasmissibile da persona a persona.

Inoltre studi filogenetici riguardanti i suddetti virus, tra questi in particolar modo il virus H5N1, hanno condotto a considerare il maiale come “recipiente di ricombinazione” per ceppi umani e aviari svolgendo pertanto un ruolo basilare nel processo di evoluzione dei ceppi pandemici [41].

L'ultima pandemia verificatasi durante il 2009 è stata provocata dalla comparsa sulla scena epidemiologica del nuovo virus A/California/7/2009 (H1N1) pdm triplo riassortante tra ceppo aviario, ceppo suino e ceppo umano.

Nel 2011 sono stati inoltre registrati negli USA i primi casi umani di infezione sostenuta da una nuova variante virale A/H3N2v nata dalla ricombinazione del virus A/H1N1(2009) pandemico con un virus A/H3N2 suino.

Le infezioni da H3N2v sono state per lo più associate all' esposizione prolungata ai suini presso le fiere agricole, mentre seppure la diffusione facilitata da uomo a uomo è stata dimostrata, non si è verificata una diffusione sostenuta in comunità [46].

2.7. Antigenic Drift

Il *drift* antigenico è determinato dall'accumulo di mutazioni puntiformi risultanti in variazioni della sequenza aminoacidica delle glicoproteine di superficie, in particolare l'emagglutinina, e quindi nella comparsa di ceppi virali immunologicamente differenti (varianti *driftate*).

Dall'analisi delle sequenze dell'emagglutinina degli isolati A/H3N2 che hanno circolato dopo l'introduzione di questo sottotipo nel 1968 è emersa la presenza di aminoacidi fortemente conservati nelle posizioni più profonde della proteina, la cui funzione è quella di ancorare gli aminoacidi superficiali e di garantire la conformazione secondaria e terziaria della catena aminoacidica. Gli aminoacidi superficiali mostrano invece un basso

grado di conservazione e possono andare incontro all' *antigenic drift* [47]. Questi dati mettono in luce come la struttura tridimensionale della proteina rimanga costante durante l'*antigenic drift* probabilmente affinché sia mantenuta la funzione biologica dell'emagglutina.

Cambiamenti dell'emagglutina interessano prevalentemente la testa globulare della glicoproteina dove si trovano i siti di legame del recettore cellulare e cinque siti antigenici ipervariabili. Le analisi di sequenza del gene del virus A sottotipo H3 hanno infatti indicato che sostituzioni aminoacidiche risultanti in drift antigenici si accumulano primitivamente in 5 regioni antigeniche, A-E, localizzate sulla superficie del dominio HA1 [48,49]. Studi sul sottotipo virale H1 hanno dimostrato a livello di HA regioni antigenicamente significative simili a quelle descritte nei sottotipi H3 [50]. Drift antigenici interessano anche NA con meccanismo analogo a quanto avviene per HA.

In vitro, la frequenza di selezione, utilizzando anticorpi monoclonali, di una variante mutata con una mutazione aminoacidica in un singolo sito è 10^{-4} - 10^{-5} [51]. Poiché un singolo anticorpo in grado di riconoscere una qualsiasi delle 5 regioni antigeniche può essere sufficiente a neutralizzare la variante, la probabilità che si sviluppi un ceppo mutato con cambiamenti in diversi siti antigenici è così bassa che è molto improbabile che si verifichi la comparsa di nuovi ceppi epidemici in presenza di anticorpi dell'ospite in grado di riconoscere diversi epitopi virali.

Tuttavia, molti soggetti, soprattutto i bambini e gli anziani, montano contro il virus influenzale una risposta immunitaria limitata che, nel caso di HA, può essere ridotta ad uno o due siti antigenici, facilitando l'insorgenza di varianti mutate [52]. Inoltre, lo spettro di anticorpi prodotti è soggetto a grande variabilità individuale. Perciò è molto probabile che la comparsa di virus epidemici sia un evento multistep attraverso infezioni successive in individui che possiedono un differente e limitato repertoire anticorpale.

I *drift* antigenici limitano il legame degli anticorpi formati durante l'incontro precedente dell'organismo ospite con il sottotipo virale e conferiscono ai virus influenzali la capacità di causare epidemie annuali in quanto la risposta antigenica alle nuove varianti risulta ridotta o comunque non ottimale, in particolar modo in soggetti con un sistema immunitario deficitario (bambini, anziani, immunodepressi).

Un esempio dell'accumularsi di mutazioni nei siti antigenici, emerso dall'analisi di sequenza dell'HA1 di 5 virus H3N2 a maggiore prevalenza nel periodo 1995-2002, è riportato nella tabella I.

VIRUS	SITO ANTIGENICO E AMINOACIDO															
	E	A						B								C
	62	121	124	133	137	142	144	156	158	160	183	186	192	194	196	276
Wuhan/335/95	K	T	G	D	Y	G	V	K	E	K	H	S	T	I	V	N
Sidney/5/97	E	N	S			R	I	Q	K					L	A	K
Moscow/10/99	E	N	S	N	S	R	I	Q	K	R				L	T	K
Panama/2007/99	E	N	S	N	S	R	N	Q	K		L		I	L	A	K
Toulouse/878/01	E	N	S	N	S	R	N	Q	K		L	G	I	L	A	K

Tabella I. mutazioni nei siti antigenici dell'HA1 dei 5 virus H3N2 a maggiore prevalenza nel periodo 1995-2002.

Nel corso della stagione 1997-1998 si è osservata l'introduzione di ceppi A/Sidney/5/97-like che hanno co-circolato con virus A/Wuhan/335/95-like già presenti nelle stagioni precedenti. La catena A/Sidney/5/97 presentava rispetto ad A/Wuhan/335/95 mutazioni localizzate nel sito antigenico A-T121N, G124S, G142R, V144I, nel sito B-K156Q, E158K, I194L, V196A, nel sito C-N276K e nel sito E-K62E. La mutazione G124S introduce, inoltre, un potenziale sito di glicosilazione. La catena A/Sidney/5/97, isolata all'inizio della stagione 1997/98, ha rimpiazzato dall'aprile '98 le catene precedentemente circolanti. Queste mutazioni hanno importanti ripercussioni sull'affinità tra anticorpi e virus. Negli anni successivi il virus A/Sidney/5/97 ha accumulato nuove mutazioni: gli isolati nel corso della stagione 2001/02 in Liguria e in Friuli Venezia-Giulia sono antigenicamente simili ad A/Toulouse/878/01 e presentano mutazioni a livello dei siti A-D133N, Y137S- e B-H183L, S186G, T192I. Queste mutazioni hanno determinato una diminuita affinità tra anticorpi indotti dall'infezione da A/Sidney/5/97 e virus A/Toulouse/878/01-like.

Un esempio attuale di Drift antigenico è quello che si sta verificando nel corso della stagione influenzale 2014-2015, in cui il ceppo H3N2 circolante A/Switzerland/9715293/2013 è mutato nei siti antigenici di HA1 rispetto al ceppo vaccinale A/Texas/50/2012, determinando una riduzione dell'efficacia del vaccino.

I virus influenzali di tipo B, nonostante la ridotta possibilità di mutazioni, possono andare incontro a *drift* e, sebbene non siano suddivisi in sottotipi, sono stati chiaramente identificati due differenti *lineages* sicuramente co-circolanti nella popolazione umana a partire dal 1988. Questi due gruppi filogenetici hanno come ceppi di riferimento i virus B/Victoria/2/1987 (Victoria-lineage) e B/Yamagata/16/1988 (Yamagata-lineage) [53]. I due *lineages* risultano così differenti antigenicamente da non presentare nessuna cross-protezione anticorpale. L'analisi di questi dati assume importanza fondamentale per la sorveglianza epidemiologica poiché da un contributo importantissimo per l'approntamento di un vaccino efficace.

3.INFLUENZA UMANA EZIOLOGIA E PATOGENESI

3.1 Trasmissione

La trasmissione del virus influenzale negli esseri umani avviene con i seguenti meccanismi [54].

a. Contatto diretto

La trasmissione del microrganismo fra un individuo infettato o colonizzato ed un ospite suscettibile avviene attraverso un contatto fisico diretto.

b. Contatto indiretto

La trasmissione avviene attraverso il trasferimento passivo del virus ad un ospite suscettibile *via* oggetto intermedio come mani contaminate e non lavate, strumenti contaminati o altri oggetti inanimati nell'ambiente circostante al paziente.

c. Droplet

La trasmissione avviene attraverso droplets di diametro superiore ai 5 μm generati nelle vie respiratorie dell'individuo infetto ed espulsi attraverso colpi di tosse, starnuti e la fonazione. I droplets sono veicolati ad una distanza di almeno un metro attraverso l'aria e si depositano sulla mucosa nasale od orale del nuovo ospite o nell'ambiente circostante. I droplets di queste dimensioni non rimangono sospesi nell'aria e non verificandosi una reale *aerosolizzazione* delle particelle non è necessaria alcuna speciale ventilazione dell'ambiente.

d. Airborne

La trasmissione avviene attraverso la disseminazione del microrganismo patogeno per *aerosolizzazione*. Il virus è contenuto in *droplet nuclei* (particelle airborne di diametro inferiore ai 5 μm risultanti dall'evaporazione dei dropltes più grandi) oppure in particelle di polvere contenenti cellule epiteliali desquamate ed altri detriti che rimangono sospese in aria per lunghi periodi di tempo. Attraverso questo meccanismo i virus sono largamente dispersi dalle correnti d'aria e vengono inalati da soggetti suscettibili che si trovano a grande distanza dalla fonte dell'infezione. Il controllo delle airborne è molto difficile da attuare poiché richiede l'utilizzo di speciali sistemi di ventilazione.

3.2. Replicazione ed eliminazione

I virus dell'influenza penetrano nelle cellule dell'epitelio colonnare del tratto respiratorio, dove si replicano, ed i nuovi virioni vengono poi rilasciati a livello della superficie apicale delle cellule. Questa modalità di rilascio limita la diffusione sistemica del virus, favorendo tuttavia il suo accumulo nel lume delle vie respiratorie e la sua trasmissione al successivo ospite suscettibile.

Studi *in vitro* hanno dimostrato che il ciclo di replicazione virale si completa in circa 4 ore. Il virus è poi rilasciato dalla cellula infettata per diverse ore prima della morte cellulare e la progenie virale infetta le cellule adiacenti, in modo tale che in un periodo molto breve moltissime cellule del tratto respiratorio vengono infettate, rilasciando a loro volta il virus e morendo [55].

Il modello di replicazione virale, in relazione alla sintomatologia clinica e la risposta immune, è stato analizzato da diversi studi. Prima dell'esordio della malattia il virus può essere rilevato per un breve periodo di tempo: nel lavaggio nasofaringeo la concentrazione del virus sale fino ad un picco di 10^3 - 10^7 TCID₅₀/ml (dose infettante da coltura tissutale dopo 50s) entro le prime 24 ore dal contatto, rimane elevata per 24-72 ore, e discende a livelli più bassi intorno al quinto giorno [56]. Nei bambini lo *shedding* virale ad alto titolo è solitamente prolungato e il virus può essere rilevato da 6 giorni prima a 21 giorni dopo l'esordio della sintomatologia [57]. Negli adulti la quantità di *shedding* virale è correlato alla severità della malattia, all'innalzamento della temperatura corporea e all'immunosoppressione.

Anche i macrofagi alveolari e le cellule dendritiche possono essere infettati dal virus e giocano un ruolo nella risposta all'influenza processando gli antigeni virali e presentandoli per il riconoscimento immunitario.

3.3. Caratteristiche cliniche dell'adulto

L'infezione da virus influenzale determina, nell'ospite adulto, un range di risposte che vanno dall'infezione asintomatica alla polmonite virale primitiva che rapidamente evolve verso l'*exitus*. La tipica sindrome influenzale non complicata è una tracheobronchite con interessamento delle piccole vie aeree.

Il periodo di incubazione varia da meno di 24 ore a 4 o 5 giorni, in relazione alla carica virale e allo stato immunitario dell'ospite.

L'esordio della malattia è solitamente caratterizzata dalla comparsa di cefalea, brividi, tosse secca, che sono rapidamente seguiti da febbre alta, mialgie, malessere generale ed anoressia. Dolore e costrizione retrosternale possono accompagnare la tosse. Il segno più importante d'infezione è la febbre che spesso raggiunge picchi entro le 24 ore fra i 38°C e i 40°C. La febbre comincia a diminuire il secondo o il terzo giorno di malattia per poi scomparire completamente intorno al sesto giorno.

I pazienti anziani possono presentare febbre alta, astenia e confusione in assenza di segni respiratori.

Reperti fisici di influenza riguardano esclusivamente il tratto respiratorio. I pazienti spesso presentano ostruzione nasale, rinorrea e starnuti; è comune una forma di faringite senza essudato. Possono inoltre manifestarsi congiuntivite ed eccessiva lacrimazione.

Piccole linfadenopatie cervicali possono essere palpate in una minoranza dei casi. La radiografia del torace e i reperti auscultatori sono normali, sebbene occasionalmente possono essere apprezzati rantoli e ronchi diffusi ai campi polmonari.

Mentre le febbre declina, i segni e i sintomi respiratori possono diventare più intensi: la tosse, da secca, spesso si trasforma in produttiva con piccole quantità di espettorato mucoide o purulento.

Dopo la risoluzione della febbre e della sintomatologia del tratto respiratorio, per 1 o 2 settimane possono residuare tosse e debolezza [58].

3.4. Complicanze respiratorie dell'influenza

Le complicanze più severe e più frequenti dell'influenza sono a carico dell'apparato respiratorio e rientrano in 4 categorie: polmonite primitiva, polmonite batterica secondaria, polmonite dovuta a patogeni atipici in soggetti immunocompromessi, ed esacerbazione di patologie polmonari croniche [59].

La polmonite primitiva si sviluppa prevalentemente in soggetti ad alto rischio per complicanze dell'infezione da virus influenzale (pazienti anziani o pazienti con malattie cardiopolmonari), ma in un 25% dei casi interessano individui senza fattori di rischio e un altro 13% donne in gravidanza. Il tipico caso di polmonite primitiva si sviluppa rapidamente dopo l'esordio della malattia. Progredisce in 6-24 ore verso una polmonite severa con tachipnea (30-60 respiri al minuto), tachicardia (oltre i 120 battiti al minuto), cianosi (nell'80% dei pazienti), febbre alta ed ipotensione. La malattia può rapidamente

evolvere verso l'ipossiemia e la morte in 1-4 giorni; la presenza di emottisi, tachipnea e cianosi rappresentano segni prognostici negativi. I reperti auscultatori includono rantoli inspiratori crepitanti bilaterali, mentre l'esame radiografico mostra addensamenti in due o più lobi polmonari.

La polmonite batterica secondaria esordisce 4-14 giorni la risoluzione dei sintomi dell'infezione influenzale con la ricomparsa di febbre, dispnea e consolidamento polmonare [60]. I patogeni più frequentemente coinvolti sono *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e, occasionalmente altri bacilli gram-negativi [61].

I meccanismi attraverso i quali i batteri agiscono sinergicamente con il virus influenzale includono un aumentata capacità di adesione ed invasione dei batteri, l'aumentata replicazione virale e modificazioni della risposta immune dell'ospite.

Diversi studi hanno riportato casi di polmoniti secondarie ad agenti patogeni atipici quali *Aspergillus* sp., *Chlamydia pneumoniae*, B-hemolytic streptococchi and *Legionella pneumophila* [62, 63]

Il virus influenzale concorre inoltre all'esacerbazione di patologie polmonari croniche in circa il 25% dei casi, sebbene gli agenti patogeni maggiormente coinvolti siano coronavirus e rinovirus [64]. I meccanismi attraverso i quali il virus influenzale ed altri virus respiratori possono indurre esacerbazioni di malattie polmonari croniche sono in larga parte ancora misconosciuti, ma sono probabilmente correlati al rilascio di mediatori dell'infiammazione, come interleuchine, citochine e modificazione del subset dei linfociti che può condurre ad un'aumentata sensibilità ad alcuni allergeni [65].

3.5. Fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze

Le patologie croniche, come malattie cardiache, malattie polmonari, diabete, malattie renali, demenza, stroke, sono tutti fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze. Senza considerare l'età, queste condizioni ad alto rischio presentano tassi più elevati per ospedalizzazione e morte. I pazienti ad alto rischio con età compresa fra i 45 e i 64 anni hanno un rischio equivalente ai pazienti con età superiore ai 65 anni [66].

Per i soggetti di età superiore ai 65 anni, le patologie ad alto rischio sono particolarmente pericolose. Secondo predizioni cliniche, questi pazienti a più alto rischio hanno un rischio 30 volte maggiore di ospedalizzazione e morte in seguito ad infezione da virus influenzale che i loro coetanei sani [67].

Un altro gruppo di rischio per complicanze dell'influenza comprende le donne in gravidanza e soggetti immunodepressi.

Nel corso della stagione influenzale, le donne con gravidanze a basso e ad alto rischio presentano, specialmente nel terzo trimestre, una maggiore incidenza di eventi cardiopolmonari rispetto a donne non gravide [68].

L'influenza è un importante causa di morbidità e mortalità nei pazienti con alterazioni della risposta immunitaria.

Pazienti con sindrome dell'immunodeficienza umana (HIV) mostrano più alti tassi di ospedalizzazione e una sua maggiore durata; anche la mortalità è aumentata rispetto alla popolazione sana [69].

I riceventi di trapianto d'organo infettati dal virus influenzale presentano un più alto rischio di complicanze con 2/3 dei soggetti che dimostra una polmonite primitiva o una polmonite batterica secondaria e un tasso di mortalità del 50% [70].

4.SORVEGLIANZA VIROLOGICA

La necessità di un perfetto matching tra i virus circolanti e i ceppi presenti nel vaccino, unita alla grande variabilità dei virus influenzali, hanno determinato il bisogno di creare un'attiva sorveglianza per aggiornare continuamente il quadro epidemiologico [86]. Già nel 1947 la sorveglianza virologica dell'influenza si era concretizzata in un network internazionale che dall'anno successivo passò sotto la guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (WHO influnet). Nel corso degli anni '60 la rete di sorveglianza si è notevolmente estesa ed oggi comprende 4 centri di riferimento internazionali che collaborano con il WHO (World Health Organization) e tre laboratori di riferimento, 118 centri di riferimento nazionali distribuiti in 89 paesi e numerosi laboratori che collaborano attivamente alla raccolta e all'isolamento dei virus influenzali e alla loro caratterizzazione molecolare ed antigenica. L'obiettivo è quello di stabilire e raccomandare due volte l'anno la composizione del vaccino antinfluenzale per la stagione successiva; la rete di sorveglianza ha anche il compito di rilevare precocemente l'emergenza di virus potenzialmente pandemici. Per questi motivi è stato necessario nel corso degli anni implementare la rete di sorveglianza virologica nell'uomo e integrarla con la sorveglianza clinico epidemiologica; è stata anche sottolineata l'importanza della creazione ed espansione di un network per la sorveglianza virologica negli animali per meglio comprendere i possibili meccanismi di ricombinazione tra clade umano e aviario che giocano un ruolo fondamentale nel meccanismo di shift antigenico.

4.1. Diagnosi dell'influenza

L'infezione da virus influenzale non può essere diagnosticata con certezza sulla base dei soli sintomi clinici. Lo scenario clinico può infatti essere difficile da distinguere dalle infezioni sostenute dal virus respiratorio sinciziale, dai virus parainfluenzali, dagli adenovirus, dai coronavirus e dai metapneumovirus [87].

La diagnosi laboratoristica è importante nella gestione dell'infezione, sia nel contesto dell'epidemia stagionale che in quello dell'evento pandemico [88]. Una rapida ed accurata diagnosi di Influenza incrementa e migliora la gestione clinica consentendo in maniera tempestiva il ricorso alla terapia antivirale e alla profilassi, l'implementazione delle

strategie per il controllo dell'infezione, e la limitazione dell'uso di indagini cliniche superflue e dell'antibioticoterapia [89].

La diagnosi laboratoristica può essere compiuta attraverso la ricerca della (i) presenza del virus o della (ii) risposta immune del paziente contro il virus.

Gli approcci diagnostici per l'identificazione del virus includono l'isolamento virale, la ricerca degli antigeni virali mediante test immunospecifici, come la microscopia ad immunofluorescenza, i test rapidi *point-of-care*, e il rilevamento degli acidi nucleici virali attraverso tecniche di amplificazione genica.

Il rilevamento di anticorpi diretti contro il virus viene in genere effettuato attraverso test di neutralizzazione virale (NT) e di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) condotti al fine di valutare la siero conversione verso uno specifico strain virale o per determinare lo status immunitario dopo la vaccinazione [89].

Poiché i test laboratoristici presentano limitazioni che possono condurre a risultati di dubbia interpretazione, è necessario che i risultati siano valutati alla luce della storia clinica del paziente. Risultati falsi negativi possono derivare dall'analisi di una bassa quantità di virus; campioni raccolti, trattati o trasportati in modo inappropriato; la presenza di inibitori virali; la comparsa di nuovi sottotipi per i quali i test non sono sensibili o specifici. Reperti falsi positivi possono risultare da errori laboratoristici, e dalla specificità subottimale del test.

a. Raccolta del campione

Il rilevamento del virus dall'aspirato nasofaringeo, dal lavaggio nasale e dal lavaggio broncoalveolare è maggiore rispetto al Tampone nasofaringeo e faringeo e all'espettorato, poiché questi ultimi contengono meno cellule colonnari e più cellule epiteliali squamose. Tamponi mono-uso contenenti terreno per il trasporto del virus sono commercializzati e facilmente disponibili. I campioni necessari per il rilevamento di acidi nucleici e dell'antigene sono simili a quelli per l'isolamento del virus [90].

b. Test antigenici rapidi (point-of-care o POC)

I più comuni test rapidi utilizzabili direttamente su campioni clinici si basano su tecniche di immunofluorescenza e immunoenzimatiche con anticorpi monoclonali tipo-specifici diretti contro gli antigeni conservati del virus influenzale.

Questi test forniscono risultati in un'ora dalla raccolta del campione e hanno una sensibilità del 60-100% rispetto alle colture cellulari [91,92].

I campioni utilizzati per i test rapidi, in ordine decrescente di sensibilità, sono l'aspirato nasofaringeo, il lavaggio/tampone nasofaringeo ed il tampone faringeo. Il momento di raccolta del campione in rapporto all'esordio della sintomatologia influenza la sensibilità del campione. Sensibilità ottimale è ottenuta quando i campioni sono raccolti entro i primi giorni di malattia, poiché lo shedding virale raggiunge il suo picco entro 48 ore dall'esordio dei sintomi, mentre i bambini presentano un alto titolo virale per un periodo di tempo più lungo [93].

Poiché la sensibilità complessiva dei test rapidi è inferiore a quella della microscopia ad immunofluorescenza e dell'isolamento in coltura cellulare, è fondamentale che il medico che utilizza questi test abbia a disposizione un laboratorio di riferimento che risolva i risultati ambigui e assicuri la qualità [94].

L'utilità clinica di questi test è correlata al suo valore predittivo positivo e negativo che è maggiore durante il picco influenzale, quando i risultati falsi positivi sono in numero inferiore e il valore predittivo positivo è alto.

c. Microscopia ad immunofluorescenza

Il rilevamento del virus influenzale mediante microscopia ad immunofluorescenza è stato inizialmente sviluppato negli anni 60 e rimane un metodo prezioso nonostante richieda infrastrutture particolarmente spaziose [95].

d. Sierologia

Una risposta sierologica anticorpale può essere documentata nell'80% delle infezioni umane di influenza. Successivamente all'infezione primitiva, è possibile rilevare IgG, IgA e IgM specifiche contro l'HA, mentre nella risposta secondaria predominano le IgG e le IgA. Tradizionalmente, gli anticorpi vengono misurati attraverso test di inibizione dell'emoagglutinina (HAI) [93].

e. Rilevamento dell'RNA virale

L'RNA del virus influenzale può essere rilevato in campioni clinici attraverso tecniche di amplificazione degli acidi nucleici come l'RT-PCR [90].

I test molecolari ad elevata sensibilità e specificità sono considerati essere i test più versatili per la diagnosi di influenza e hanno ormai sostituito l'isolamento virale.

Sono attualmente disponibili test multiplex PCR per la determinazione in un'unica reazione dei principali virus agenti eziologici di infezioni delle alte e basse vie aeree.

Infatti, sebbene alcuni studi abbiano documentato una sensibilità sovrapponibile delle tecniche di rilevamento degli acidi nucleici rispetto alle colture cellulari, altri hanno riportato una sensibilità maggiore del 5-15% utilizzando tecniche di RT-PCR [96-98].

Inoltre la qualità del campione, il tempo e le condizioni del trasporto, possono essere meno critici per il rilevamento dell'RNA virale piuttosto che per le colture cellulari o i test di rilevamento degli antigeni, poiché non è necessario che le cellule infettate o i virus disponibili siano preservati.

L'RNA del virus influenzale è rilevabile durante il decorso clinico per un periodo di tempo più lungo rispetto al virus utilizzato per le colture cellulari.

L'RNA virale viene estratto dal campione e attraverso la metodica di RT-PCR può essere utilizzato per confermare la presenza di virus influenzale ma anche, grazie all'analisi di sequenza, per determinarne il sottotipo e lo strain.

Il genotipo virale può essere determinato attraverso il sequenziamento di alcuni o di tutti i geni virali, sebbene esso spesso richieda, l'isolamento del virus in coltura cellulare.

4.6. Sorveglianza virologica durante la stagione 2015-2016 e 2016-2017

In Italia, la sorveglianza virologica dell'influenza è coordinata dal Centro Nazionale OMS per l'Influenza (National Influenza Centre - NIC) dell'Istituto Superiore di Sanità (Dipartimento di Malattie Infettive) e viene svolta in collaborazione con una rete di 14 laboratori di riferimento regionale (Rete Influnet), periodicamente validati dal NIC attraverso lo svolgimento di controlli di qualità (QCA).

I laboratori Influnet, accreditati per la diagnostica dei virus influenzali epidemici, sono distribuiti su tutto il territorio Nazionale.

La sorveglianza virologica svolta in periodo inter pandemico ha l'obiettivo di caratterizzare a livello molecolare i virus circolanti durante il periodo invernale e alla valutazione del grado di omologia antigenica tra ceppi epidemici e vaccinali; solo attraverso l'impiego di

complesse metodiche laboratoristiche è reso possibile l'aggiornamento annuale della composizione vaccinale.

In caso di emergenza pandemia, la rete Influnet si avvale della collaborazione di 6 ulteriori laboratori, coinvolti in particolare nella gestione delle forme gravi e/o pandemiche.

Nel corso della stagione 2015/2016 e 2016/17, nell'ambito delle attività di laboratorio, sono stati raccolti ed analizzati rispettivamente 8.971 e 12.034 campioni clinici, di cui 2.456 (27%) nella stagione 2015-2016 e 3.518 (29%) nella stagione 2016/2017 sono risultati positivi al virus influenzale. Il primo virus influenzale della stagione 2015/2016 è stato identificato in un campione di una paziente di 91 anni ricoverata presso il Policlinico S.Orsola-Malapighi di Bologna con sintomi di tipo influenzale e polmonite nella settimana 41/2015 ed apparteneva al sottotipo H3N2. Durante questa stagione si è verificata la co-circolazione di ceppi di tipo A e di tipo B, sebbene i virus di tipo B siano risultati leggermente prevalenti (57%) rispetto ai virus di tipo A.

La stagione 2016/2017 è stata caratterizzata da un avvio anticipato e già nel mese di settembre alcuni laboratori di riferimento (Bari, Parma, Perugia, Roma, Torino) hanno segnalato casi sporadici di influenza, tutti associati a virus A(H3N2), alcuni dei quali da soggetti di ritorno dall'estero. (Fig.9)

Durante tutta la suddetta stagione vi è stata una netta predominanza dei virus influenzali di tipo A (95%), in particolare di quelli appartenenti al sottotipo H3N2 (99% dei ceppi A sottotipizzati). Solo a partire da metà febbraio 2017 si è osservata una proporzione crescente dei virus di tipo B, la cui circolazione si è comunque sempre mantenuta a bassi livelli (5%).

I risultati delle analisi di caratterizzazione antigenica e molecolare, effettuate sui ceppi A(H3N2), hanno permesso di confermare l'appartenenza di tutti i ceppi analizzati al sottogruppo genetico 3C.2a in entrambe le stagioni influenzali, la maggior parte dei quali confluisce all'interno del più recente sub-clade 3C.2a1, definito dalle sostituzioni amminoacidiche N171K, I406V e G484E nel gene HA, rispetto al ceppo vaccinale A/Hong Kong/4801/2014 (sottogruppo 3C.2a). E' stato tuttavia sottolineato dall'OMS e dall'ECDC che i virus appartenenti ai due suddetti sottogruppi genetici risultano antigenicamente simili.

La caratterizzazione molecolare dei virus A(H1N1)pdm09 ha mostrato nella stagione influenzale 2015/2016 una buona reattività verso il ceppo A/California/7/2009 che è poi stato incluso nel vaccino anti-influenzale per la stagione 2016/2017 ed ha confermato

l'appartenenza al gruppo genetico 6B.1 in entrambe le stagioni, a cui appartiene il ceppo di riferimento A/Michigan/45/2015 che è stato incluso invece nella nuova composizione vaccinale per l'emisfero Nord, per la stagione 2017/2018.

I virus influenzali di tipo B appartenenti ai due lineaggi B/Yamagata/16/88 e B/Victoria/2/87 hanno co-circolato, sebbene i ceppi appartenenti al lineaggio B/Yamagata siano risultati largamente predominanti (96%) in ambedue le stagioni.

Le analisi molecolari hanno evidenziato che i ceppi italiani appartenenti al lineaggio B/Yamagata confluiscono, in particolare nelle ultime due stagioni influenzali sono risultati appartenenti al gruppo genetico 3, il cui ceppo di riferimento è il B/Phuket/3073/2013 mentre quelli appartenenti al lineaggio B/Victoria appartengono al gruppo genetico 1A.

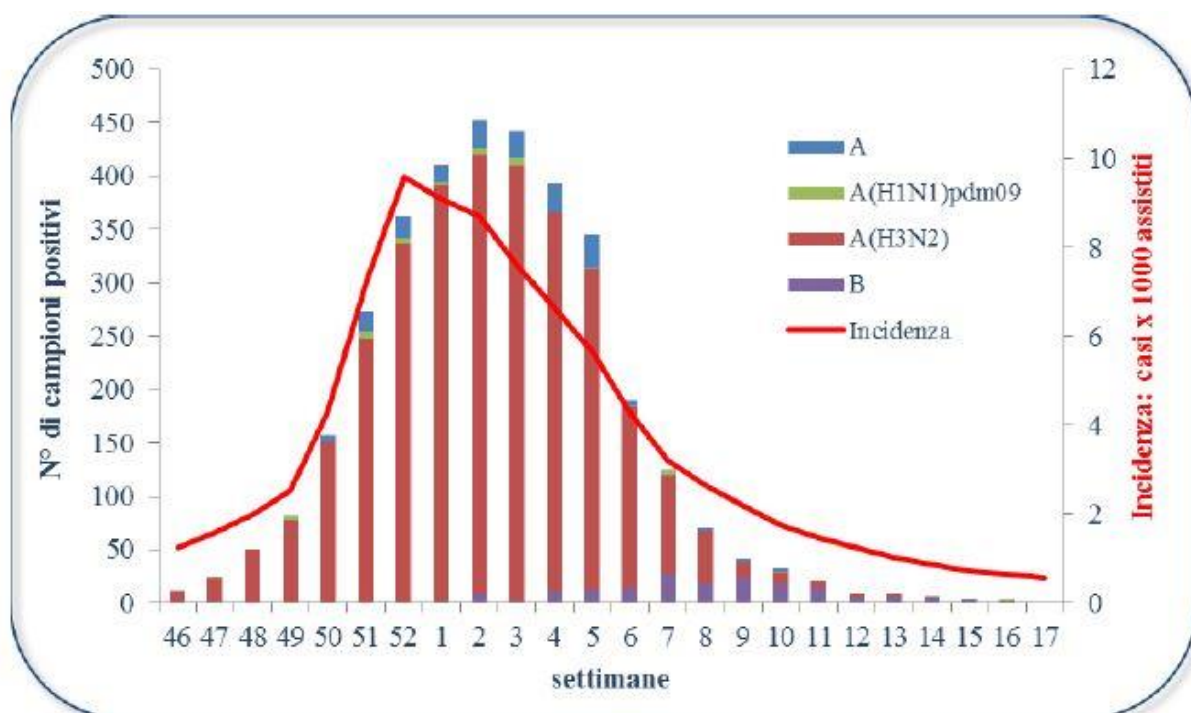


Figura 9 Andamento settimanale dei campioni positivi per influenza, per tipo/sottotipo (stagione 2016/2017)

5.SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

5.1 Epidemiologia dell'influenza

Le epidemie stagionali di influenza si presentano, nelle zone a clima temperato, principalmente durante il periodo invernale mentre nelle regioni tropicali l'influenza può diffondersi e provocare focolai irregolari durante tutto l'anno.

A livello globale l'influenza si verifica a livello mondiale con un tasso annuo di attacco del 5%-10% negli adulti e del 20%-30% nei bambini. Le infezioni influenzali inoltre, soprattutto tra i gruppi ad alto rischio (i bambini, gli anziani ed i malati cronici) possono essere la causa di ospedalizzazione e decessi; è stato stimato che, a livello mondiale i focolai epidemici annuali possono comportare circa 3- 5 milioni di casi di malattia grave, e circa 250 000 a 500 000 morti.

I principali problemi di sanità pubblica associati alle epidemie influenzali sono: (i) le morti associate alle forme influenzali più severe, che si presentano principalmente nei soggetti over 65 anni, (ii) l'elevata morbidità che si traduce in elevati tassi di assenteismo dal lavoro o scuola e conseguente perdita della produttività, (iii) affollamento di cliniche ed ospedali durante il picco epidemico.

Nonostante non siano ancora del tutto chiari gli effetti delle epidemie stagionali di influenza nei paesi in via di sviluppo, recenti stime indicano che ogni anno una grossa percentuale di bambini muoiono per influenza. [99]

Nel mondo è stata implementata una fitta rete di sorveglianza epidemiologica che si avvale di centri a livello Nazionale ai quali afferiscono settimanalmente i dati relativi ai casi di Influenza like-illness (Ili) e di Acute respiratory tract infection (Ari) raccolti da medici sentinella (Mmg-Medici di medicina generale) e dai centri di Riferimento Subnazionali.

Dai dati forniti dalla rete INFLUNET, per la sorveglianza delle sindromi simil-influenzali in Italia, è emerso che in media ogni anno l'influenza colpisce l'8% (range: 4-12%) della popolazione italiana.

Facendo riferimento ai dati registrati nel corso delle diverse stagioni influenzali, questi evidenziano un andamento epidemico che generalmente raggiunge il picco all'inizio del mese di febbraio e colpisce in particolar modo la fascia pediatrica; l'incidenza cumulativa decresce all'aumentare dell'età toccando i valori minimi negli ultra 65enni. [100]

5.1 Sorveglianza epidemiologica durante la stagione 2015-2016 e 2016-2017

In Italia l'attività di sorveglianza epidemiologica delle sindromi influenzali è coordinata dal Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con il Centro Interuniversitario per la Ricerca sull'Influenza (CIRI) di Genova e il contributo dei medici di medicina generale e pediatri di libera scelta, dei referenti presso le Asl e le Regioni.

Nella stagione 2015/2016 il picco epidemico è stato raggiunto nell'ottava settimana del 2016 con un'incidenza del 6,1 casi per 1000 assistiti. Nel 2016-2017, il picco epidemico è stato raggiunto nell'ultima settimana del 2016 in anticipo di circa quattro settimane rispetto alle stagioni precedenti e con un livello di incidenza pari a 9,5 casi per 1.000 assistiti. Il periodo epidemico sia nel 2015/2016 che nel 2016/2017 (incidenza superiore a 2,44 casi per 1.000 assistiti) ha avuto una durata di 12 settimane.

L'incidenza cumulativa osservata durante la stagione 2015/2016 è stata pari a 82 casi e 93 casi nel 2016/2017 per 1.000 assistiti.

La stagione influenzale è stata caratterizzata, quindi, da una bassa incidenza cumulativa per quanto riguarda la stagione 2015/2016, mentre nell'ultima stagione ha avuto un'incidenza cumulativa di media entità (116 casi per 1.000 nella stagione 2004-2005, 99 casi per 1.000 assistiti nella stagione pandemica 2009-2010).

Nella stagione 2015/16 sono stati segnalati 89 casi gravi e 32 decessi di influenza confermata da 13 regioni e province autonome; quest'ultima stagione rispetto alle precedenti è stata caratterizzata da un numero di casi gravi e decessi sovrapponibile a quanto osservato nelle stagioni precedenti.

L'impatto dell'influenza in questa ultima stagione, in termini di numero di casi gravi e di decessi da influenza confermata, invece è stato di media entità e sono stati segnalati più casi gravi e decessi. In particolare nella stagione 2016/17, sono stati segnalati 162 casi gravi e 68 decessi da influenza confermata da 11 regioni e province autonome.

Nella maggior parte dei casi gravi è stato isolato il virus A/H3N2, seguito dal virus A/H1N1pdm09 e dal virus B.

Durante queste due stagioni, l'età mediana dei casi gravi è stata rispettivamente 57 anni nel 2015/2016 e di 73 anni nel 2016/2017; tra i decessi è stata di 59 anni nel 2016/2017 e 76 anni nel 2016/2017. Nella maggior parte dei casi gravi di decessi segnalati al sistema, presentavano almeno una patologia cronica preesistente per la quale la

vaccinazione antinfluenzale viene raccomandata e solo la gran parte dei soggetti non era vaccinato. Tre donne erano in gravidanza al momento della segnalazione nella stagione 2015/2016, tutte sono state ricoverate in terapia intensiva, due presentavano una condizione di rischio preesistente e non erano vaccinate; mentre nessuna donna in gravidanza è stata segnalata nella stagione 2016/2017.

6. LA VACCINAZIONE ANTINFLUENZALE

La vaccinazione è la principale strategia di prevenzione dell'influenza allo scopo di ridurre l'impatto che le epidemie stagionali hanno in termini di morbidità e mortalità.

L'impiego della vaccinazione antinfluenzale si basa sulle evidenze scientifiche che ne confermano l'efficacia in termini di riduzione della morbosità e soprattutto nella riduzione del numero di ospedalizzazioni dovute a influenza, enfisema ed altre patologie cardiopolmonari [103-104].

La vaccinazione antinfluenzale è una pratica efficace; la sua efficacia può variare in rapporto a due fattori: uno, prevedibile, rappresentato dall'età dei vaccinati; l'altro, poco prevedibile rappresentato dalla corrispondenza (*match*) fra caratteristiche antigeniche del virus presente nel vaccino e caratteristiche dei virus circolanti durante la stagione invernale.

Diversi tipi di vaccino antinfluenzale sono disponibili e utilizzati da più di 60 anni: sono sicuri ed efficaci nella prevenzione della malattia e degli effetti più severi dell'infezione.

6.1. Vaccino con virus inattivato

In Europa e negli Stati Uniti sono attualmente disponibili per la vaccinazione antinfluenzale attraverso somministrazione parenterale esclusivamente i vaccini con virus inattivato (vaccino con virus intero, vaccino split, vaccino a subunità).

Il vaccino antinfluenzale viene preparato annualmente e contiene nella sua formulazione gli strain virali che hanno causato epidemie nell'emisfero opposto e che quindi con maggiore probabilità circoleranno nella stagione successiva. Queste informazioni sono rese disponibili dai dati registrati dal sistema di sorveglianza [105].

I ceppi del virus utilizzati nella produzione vaccinale sono coltivati sul corio allantoide di uova embrionate di pollo; dopo due o tre giorni di incubazione, i fluidi allantoidi vengono rimossi e le particelle del virus vengono purificate in un'ultracentrifuga zonale. Solitamente l'infettività del virus viene inattivata con formaldeide.

Il prodotto viene poi purificato con tecniche che garantiscono la rimozione di materiale aspecifico (residui proteici di cellule embrionali di pollo) il quale è responsabile di fenomeni allergici in soggetti suscettibili.

Attualmente nel mondo sono ancora in commercio alcuni vaccini a virus interi, ma la maggior parte dei vaccini sono o split o vaccini a subunità.

a. Vaccino split

Il vaccino *split* è costituito da frammenti virali prodotti grazie a trattamenti di natura chimica. Il vaccino è prodotto, trattando il virus con detergenti o solventi che distruggono la membrana lipidica del virus.

Le attuali tecniche di produzione permettono di avere, alla fine del processo, un preparato completamente privo di detergenti e della componente lipidica della membrana responsabile di effetti tossici.

b. Vaccino a subunità

Il vaccino a subunità contiene solamente le glicoproteine virali di superficie: HA e NA.

6.2. Vaccino con virus vivo attenuato

Il vaccino a virus vivo attenuato è autorizzato per la somministrazione intranasale nei soggetti di età compresa fra i 5 e i 49 anni.

La licenza è stata concessa dopo numerosi trials clinici che ne hanno confermato l'efficacia nella popolazione pediatrica [106] e negli adulti [107].

Numerose evidenze cliniche indicano la possibilità di un'espansione del suo utilizzo: l'attuale vaccino attenuato è primariamente raccomandato per i soggetti ad alto rischio di contrarre l'infezione influenzale, ma in questo gruppo di persone non induce ancora una completa protezione.

Il vaccino da virus vivo attenuato sembra tuttavia avere la potenzialità di allargare le indicazioni per il vaccino influenzale e quindi avere un impatto sulla morbidità complessiva e forse sulla diffusione della malattia [108]. Questo vaccino sembra essere sicuro in tutte le fasce d'età, sebbene alcuni studi hanno documentato un aumento di patologie reattive delle vie aeree dopo la sua somministrazione [109].

L'immunità locale indotta dal vaccino è riconosciuto avere un ruolo importante nella resistenza contro la maggior parte dei patogeni respiratori. L'infezione delle vie respiratorie indotta dal vaccino vivo attenuato sembra essere molto efficiente nello sviluppo sia di una risposta immunitaria sistemica che di una risposta immunitaria locale [110].

6.3 Vaccini adiuvati

La formula vaccinale può essere addizionata di sostanze adiuvanti per migliorarne il potere immunizzante.

Il termine adiuvante deriva infatti dal latino *adiuvare* ed è utilizzato per indicare sostanze che, associate ad uno specifico antigene, sono in grado di potenziarne l'immunogenicità favorendo la comparsa di una risposta immune specifica più potente e duratura.

Il termine fu coniato da Ramon in seguito all'osservazione che la risposta immune alla somministrazione nel cavallo delle tossine difterica e tetanica, poteva essere artificialmente incrementata aggiungendo agli antigeni immunizzanti sostanze diverse (es: agar, lecitina, saponina, e perfino pane grattugiato) [111,112].

Negli ultimi 70 anni sono state valutate diverse formulazioni di adiuvanti, e molte sono state testate nel corso di *trials* clinici [113-116], ma alcune di esse non sono state poi utilizzate principalmente a causa dei loro effetti collaterali e della tossicità.

Negli ultimi anni gli adiuvanti hanno ricevuto maggiori attenzioni a causa dello sviluppo di vaccini purificati, a subunità e sintetici che presentano uno scarso potere immunogeno e pertanto necessitano di molecole adiuvanti per elicitarne una risposta immune più efficace.

La risposta del sistema immunitario può infatti essere selettivamente modulata verso il sistema maggiore di istocompatibilità di classe I o classe II (MHC I, MHC II) e verso una risposta di tipo T-helper 1 o T-helper 2, molto importante nella protezione delle infezioni provocate da patogeni intracellulari come virus, parassiti e batteri. In generale l'adiuvante ideale, oltre ad essere in grado di potenziare la risposta immune nei confronti degli antigeni vaccinali, di stimolare l'appropriato profilo citochinico e di conferire immunoprotezione a lungo termine, deve avere una composizione chimica ben definita, essere biodegradabile e incapace di indurre reazioni avverse importanti sia locali sia sistemiche. In base alla loro capacità immunomodulatoria, queste molecole possono essere suddivise in tre gruppi: i) sostanze che modulano il rilascio dell'antigene in circolo (funzione di deposito), ii) sostanze che agiscono da veicolo di trasporto per l'antigene con conseguente attivazione delle *antigen presenting cells*, iii) sostanze che agiscono da immunostimolatori.

a. Sali di Alluminio

I Sali di Alluminio rimangono relativamente poco costosi, e sono ritenuti sicuri e semplici da formulare [117,118]. Il loro meccanismo d'azione consiste nel favorire il lento rilascio dell'antigene dalla sede di inoculo, indurre l'attivazione del complemento e dei macrofagi,

stimolare l'assorbimento dell'antigene e il suo successivo processamento da parte delle *Antigen Presenting Cells* (APC) [106]. I sali di alluminio inducono una risposta anticorpale rapida, elevata e duratura; attivano i linfociti T-helper 2 (TH2) determinando la stimolazione dei linfociti B. Tra gli svantaggi sono da menzionare reazioni locali quali reazioni eritematose, la possibile induzione di noduli dolenti, ipersensibilità e reazioni infiammatorie granulomatose.

b. Emulsioni Acqua-Olio

Le emulsioni acqua-olio sono microgocce di acqua in fase oleosa continua, stabilizzate con surfattanti. A questo gruppo appartiene l'adiuvante incompleto di Freund impiegato in vaccini umani, in particolare il vaccino antinfluenzale e il vaccino antipolio, e soprattutto ad uso veterinario [119]. Il loro meccanismo d'azione consiste nel produrre depositi a breve termine e favorire il lento rilascio dell'antigene dalla sede di inoculo stimolando la produzione di anticorpi [120]. L'antigene, idrofilico, viene inglobato in microgocce d'acqua (fase acquosa) nell'emulsione lipidica per aumentare la risposta immune.

c. Emulsioni Olio-in-Acqua

Le emulsioni olio-in-acqua sono microgocce di olio stabilizzate con surfattanti in fase acquosa continua. Ricerche condotte nell'animale e nell'uomo hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza dell'adiuvante MF59™, un'emulsione olio in acqua costituita per il 4,3% da squalene stabilizzato con 0,5% Tween 80 e 0,5% Span85, emulsionato in condizioni di alta pressione in un microfluidificante e trasformata in piccole droplets uniformi [121]. Testato su modelli animali, MF59™ aumenta la risposta immune contro diversi antigeni, compresi gli antigeni di CMV, HSV, HIV, HCV, HPV, HBV, malaria e virus influenzale. Nell'uomo, MF59™ è stato dimostrato incrementare la risposta umorale e cellulare contro HIV, HSV ed altri antigeni ed avere un buon profilo di sicurezza. Inoltre MF59™ ha dimostrato indurre una produzione di anticorpi molto elevata maggiore rispetto a quella elicitata dai sali di alluminio. Diversi studi dimostrano che i vaccini adiuvati con MF59™ sono sicuri e ben tollerati negli anziani anche se dopo l'immunizzazione le reazioni locali, seppur di moderata intensità e di breve durata, sono più frequenti nel vaccino adiuvato con MF59™ rispetto a quanto avviene con i vaccini non adiuvati [122].

I vaccini adiuvati con MF59™ sono in grado di conferire una maggiore siero protezione nei soggetti adulti portatori di patologie croniche predisponenti allo sviluppo di complicanze

dell'influenzale come malattie cardiache, polmonari, renali, diabete, cancro, e condizioni di immunodepressione [123].

Uno studio condotto recentemente su soggetti HIV-1 positivi ha dimostrato che il vaccino adiuvato con MF59™ determina una maggiore immunogenicità rispetto ad un vaccino non adiuvato, con però differenze significative fra i diversi strain virali studiati; non è ancora tuttavia possibile giungere ad una conclusione definitiva sulla significatività clinica di questi risultati poiché il metodo utilizzato per stimare la risposta anticorpale non è ancora standardizzato per il vaccino anti-influenzale [124].

d. Liposomi

I Liposomi sono vescicole con una membrana singola o multilamellare di dimensioni comprese tra 20nm e 3µm e nella cui struttura sono inclusi colesterolo e fosfolipidi. Possono veicolare diversi antigeni quali ad esempio il lipopolisaccaride (LPS), le citochine, il lipide A [125].

L'immunogeno può essere adeso alla membrana vescicolare oppure essere contenuto all'interno degli spazi della membrana. I liposomi hanno la capacità di stimolare una buona risposta citotossica e dunque sono potenzialmente assai utili per indurre una risposta immune nei confronti dei patogeni intracellulari. Il loro utilizzo è reso problematico dal fatto che essi sono poco stabili e di non semplicissima costruzione in quanto la veicolazione dell'immunogeno, incorporato o adeso, è spesso difficoltosa.

e. Virosomi

I Virosomi sono un altro tipo di liposomi creati inserendo proteine di fusione virali nel doppio strato lipidico di un liposoma. Queste preparazioni hanno proprietà adiuvanti maggiori se utilizzati per veicolare antigeni incapsulati. Su questo principio si basano i vaccini anti-epatite A e anti-influenzali [126]. La membrana vescicolare è costituita da fosfolipidi presenti comunemente nell'organismo umano e da fosfolipidi derivati dal virus influenzale. Sulla superficie del virosoma vengono adese l'HA e la NA purificate del virus influenzale e l'antigene vaccinale che, nel caso del vaccino anti-epatite A è costituito da particelle virali inattivate. Questo tipo di adiuvante viene facilmente fagocitato dai macrofagi ai quali si lega mediante l'HA con la quale lega anche i recettori dei linfociti B stimolandoli a proliferare.

Nonostante le difficoltà incontrate nello sviluppo di adiuvanti per i vaccini umani, recentemente si sono ottenuti numerosi progressi in particolare nella comprensione: dei

meccanismi molecolari di azione di queste molecole, del ruolo delle citochine e dei diversi tipi di cellule coinvolte nella risposta immune. I sali di alluminio continueranno ad essere utilizzati visti i vantaggi che offrono (sicuri, semplici da formulare immunogeni) in associazione a tipi di antigeni diversi. Nel caso, però, di vaccini purificati, a subunità o sintetici si rendono necessari adiuvanti più potenti a causa del limite dei sali di alluminio rappresentato dalla loro incapacità di elicitarne una risposta immunitaria cellulo-mediata. Altri adiuvanti, inclusa la stearyl-tirosina, la γ -inulina e le citochine hanno dimostrato ottima attività immunomodulatoria dimostrando che il numero di molecole a disposizione in grado di potenziare la risposta immune è in crescita.

6.4 Vaccino intradermico

Fino a pochi anni fa, i vaccini antinfluenzali stagionali sono stati somministrati per via intramuscolare (IM) tramite iniezione, tra le alternative proposte che incentivano la copertura vaccinale, recentemente si è affiancata la vaccinazione intradermica.

Sfruttando l'elevata quantità di cellule dendritiche nel derma e l'efficiente drenaggio linfatico garantito da una fitta rete microcapillare presente nella pelle la vaccinazione ID provoca una potente immunogenicità [127-128].

Il primo vaccino intradermico approvato all'uso nel 2009 è la formulazione split Intanza® somministrato mediante il sistema di microiniezione BD Soluvia.[128]

Studi clinici hanno dimostrato che nelle persone anziane Intanza® 15 mg è più immunogenico rispetto ai vaccini split o a sub unità somministrati per via intramuscolare standard. In particolare, valutando la risposta immunitaria contro i ceppi inclusi nella composizione vaccinale, è stata dimostrata un'immunogenicità comparabile a quella ottenuta con la somministrazione dei vaccini adiuvati con MF59 [129, 130].

La risposta cellulare alla vaccinazione intradermica è riassunta in una revisione del 2011 pubblicata su Human Vaccine da Combadiere e Liard [131]

In seguito all'iniezione intradermica, l'antigene viene captato dalle cellule presentanti l'antigene (APC) in particolare cheratinociti epidermici, cellule di Langerhans e cellule dendritiche dermiche sono attivate dagli antigeni del vaccino, che portano alla loro migrazione attraverso il derma e, infine, ai linfonodi drenanti.

Le cellule dell'immunità innata assunte nella pelle possono catturare gli antigeni o possono attivarsi tramite i Toll-like receptors e recettori leganti i nucleotidi con dominio a ripetizione ricco in leucine.

Inoltre, i piccoli componenti del vaccino (<400 nm) possono essere trasportati passivamente agli organi linfoidi secondari tramite la rete microcapillare vascolare e le vie linfatiche

Nei linfonodi drenanti, le APC presentano i loro antigeni alle cellule $CD4^+$, $CD8^+$, T e cellule B; questo attiva le cellule T, che portano alla proliferazione e differenziazione in cellule effettrici della memoria induce poi l'espansione clonale e l'attivazione delle cellule B nei centri germinali.

Le cellule T e B effettrici migrano nella zona in cui è avvenuta la vaccinazione presso cui eliminano antigeni del vaccino e si differenziano in cellule T e B della memoria. In sintesi, le cellule B e T della memoria e generate nei linfonodi drenanti periferici a seguito della vaccinazione intradermica fornire immunità a lungo termine contro l'antigene mirato. (Figura

14)

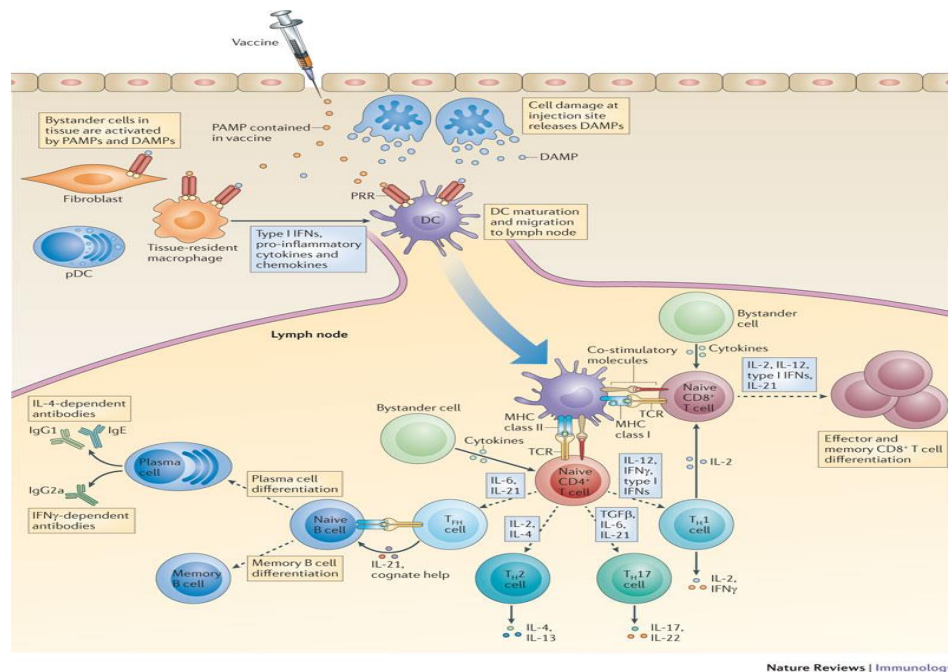


Figura 14. Immunità innata e cellulo mediata scaturita dalla vaccinazione antinfluenzale intradermica.

Il Vaccino intradermico è disponibile in commercio attraverso due diverse formulazioni Intanza 9 µg e Intanza 15 µg che differiscono per quantità di antigene contenuto; entrambi sono vaccini split che contengono il virus influenzale inattivato.

L'OMS ha indicato che la composizione del vaccino per l'emisfero settentrionale nella stagione 2016/2017 sia la seguente:

- **A/California/7/2009 (H1N1)** - presente anche nel vaccino 2015/2016
- **A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)** - nuova variante
- **B/Brisbane/60/2008 (lineaggio B/Victoria)** - nuova variante

7. IL PROGETTO I-MOVE PLUS

L'efficacia vaccinale (EV) dei vaccini antinfluenzali, varia di anno in anno tra sottogruppi di popolazione (fasce di età, gruppi a rischio) e si differenzia per tipo e sottotipo di virus influenzale. Inoltre, è solo parzialmente correlata al grado di corrispondenza virologica tra i ceppi di virus inclusi nel vaccino e quelli circolanti ed i correlati immunologici di protezione non sono ben definiti.

Di conseguenza, a partire dal 2014 l'Agenzia europea del Farmaco (EMA) ha iniziato una consultazione per la revisione delle linee guida per la conduzione degli studi sui vaccini antinfluenzali da parte delle aziende produttrici prima della loro commercializzazione. Il 29 luglio 2016 sono state pubblicate le linee guida ufficiali che evidenziano l'importanza di monitorare ogni stagione l'efficacia sul campo (EV) e la sicurezza dei vaccini disponibili in commercio.

Al fine di misurare l'efficacia sul campo dei vaccini nel prevenire l'influenza confermata, è stato istituito nel 2007 un consorzio europeo "Integrated Monitoring of vaccines effects in Europe" (I-MOVE), finanziato dal Centro europeo per la Prevenzione e controllo delle malattie (ECDC) e nell'ambito del programma HORIZON 2020. Esso è coordinato da EpiConcept e comprende istituti di Sanità Pubblica di 11 Paesi europei. Nell'ambito del consorzio I-MOVE, nel 2010 è stata inoltre attivata un network che coinvolge 25 ospedali in 10 paesi EU per un progetto I-MOVE +, che mira a misurare l'EV nei confronti di casi gravi che necessitano ricovero ospedaliero tra la popolazione ultrasessantacinquenne. Il progetto ha ottenuto un finanziamento per tre stagioni (a partire da 2015/16). Per l'Italia partecipa al consorzio, l'Istituto Superiore di Sanità, in virtù dell'esperienza maturata nel coordinamento di diversi studi di efficacia sul campo dei vaccini antinfluenzali.

Durante le scorse stagioni influenzali, è stato condotto uno studio pilota in 3 ospedali. Attraverso tale studio è stata stimata l'EV nei confronti del vaccino stagionale 2015/16, contro i casi gravi di influenza confermati in laboratorio in ultrasessantacinquenni ricoverati, attraverso uno studio caso-controllo.

La stima puntuale di EV è risultata bassa, pari al 37,8% (95%CI: -61,0 - 76,7%) nei confronti di tutti i tipi di virus influenzali e pari al 32,0% (95%CI: -83,3 - 74,8) dopo aggiustamento per età e mese di inizio sintomi. La bassa EV riflette probabilmente la limitata dimensione del campione, dovuta principalmente alla scarsa attività virale durante questa stagione e al ritardo del picco rispetto alle precedenti stagioni. Le variazioni annuali nell'attività virale, nella patogenicità dei ceppi e il grado di corrispondenza antigenica fra i ceppi vaccinali e quelli circolanti, sono tutti fattori che possono condizionare le stime di EV

insieme alla copertura vaccinale. La copertura vaccinale stimata nello studio è stata pari al 47,9%, sostanzialmente in linea con il dato nazionale del 49,9% nella stessa fascia di età.

Questo tipo di studio è un importante complemento agli studi tradizionali e contribuisce quindi ad una più precisa comprensione e stima dell'EV influenzale nei confronti delle forme severe di influenza.

8.OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo principale dello studio è di misurare l'efficacia sul campo dei vaccini antinfluenzali nei confronti delle Sindromi respiratorie acute gravi (Severe Acute Respiratory Infections - SARI) causate dai virus influenzali, nella popolazione di età >65 anni ricoverata in ospedale, al fine di conoscere i fattori che influiscono sull'efficacia vaccinale (EV), sulla durata della protezione ed sul ruolo della rivaccinazione annuale.

Nel dettaglio, l'efficacia sul campo sarà stimata:

- complessivamente e per tipo/sottotipo di virus circolante;
- per particolari gruppi a rischio (ad esempio specifiche condizioni croniche);
- per fascia di età (65-79 anni, >80 anni);
- per tipo di vaccino (adiuvato/non adiuvato; vivo/attenuato; trivalente/quadrivalente);
- per marchio/prodotto commerciale, se la dimensione del campione permette l'analisi.

In aggiunta, lo studio si ripropone di comprendere i fattori che influenzano l'EV, la durata della protezione, il ruolo delle vaccinazioni stagionali ripetute.

Infine, di identificare i punti chiave dell'evoluzione fenotipica e genotipica dei virus influenzali che potrebbero condizionare le prestazioni del vaccino e la stima di EV per clades specifici.

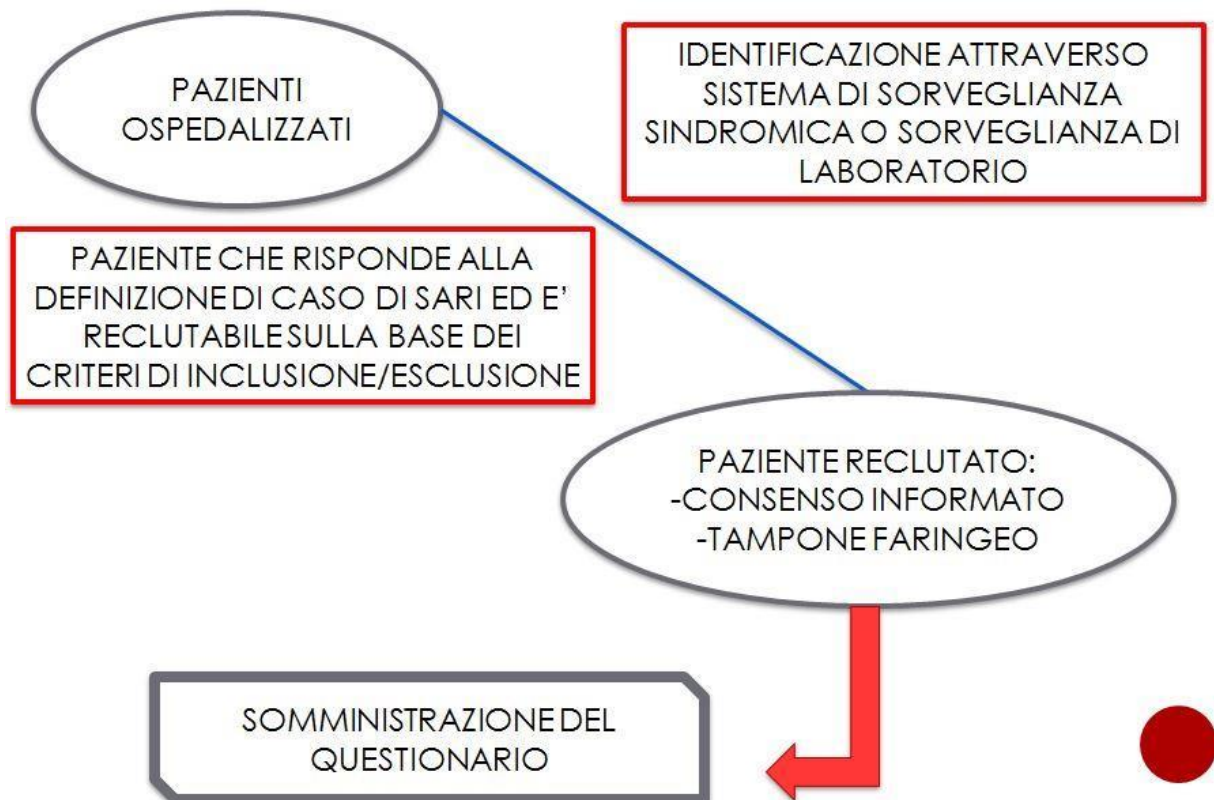


Fig. 15 Schema di reclutamento pazienti studio I-MOVE+

8.1 METODI

8.1.1 Disegno dello studio

Lo studio si configura come uno studio osservazionale caso controllo in cui i casi di SARI confermati per influenza ed i controlli verranno identificati come tali successivamente all'esecuzione del test di laboratorio in pazienti di età ≥ 65 anni ospedalizzati.

8.1.2 Centri partecipanti

Per la realizzazione degli obiettivi del presente studio sono stati coinvolti diversi Centri che coordinano le attività al livello locale. Al momento, partecipano allo studio tre Centri:

- Dipartimento di Scienze biomediche e oncologia umana, Università degli Studi di Bari,
- Dipartimento di Fisiopatologia, Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Siena,
- Laboratorio di Igiene- DISSAL- Policlinico San Martino di Genova

8.1.3 Popolazione in studio

Tutti i soggetti non istituzionalizzati, di età > 65 anni, ricoverati per SARI, che non presentino controindicazioni alla vaccinazione antinfluenzale. In particolare sono stati arruolati pazienti con i seguenti sintomi:

- almeno un segno o sintomo sistemico (febbre o febbre, cefalea, mialgia, malessere generalizzato) o deterioramento delle condizioni generali (astenia, perdita di peso, anoressia o confusione e vertigini) e
- almeno un segno o sintomo respiratorio (tosse, mal di gola, difficoltà respiratorie) presenti al momento del ricovero o nelle 48 ore successive all'ammissione in ospedale. La data di inizio sintomi (o l'aggravamento delle condizioni di base, se croniche) non deve superare i 7 giorni precedenti l'ammissione in ospedale.

Sono stati definiti i casi e i controlli in questo modo:

Caso di SARI positivo per virus influenzali (caso)

Un paziente ricoverato con diagnosi di SARI con data inizio sintomi inferiore ai 7 giorni l'ammissione in ospedale e con un tampone faringeo (o nasofaringeo) positivo per uno o più virus influenzali.

Caso di SARI negativo per virus influenzali (controllo)

Un paziente ricoverato con diagnosi di SARI con data inizio sintomi inferiore ai 7 giorni l'ammissione in ospedale e con un tampone faringeo (o nasofaringeo) **negativo** per virus influenzali.

Mentre sono stati esclusi dallo studio soggetti con le seguenti caratteristiche:

- ha meno di 65 anni di età al momento del ricovero;
- ha una controindicazione alla vaccinazione antinfluenzale;
- l'insorgenza sintomi della SARI è >48 ore successive il ricovero in ospedale;
- non è disponibile alla partecipazione o impossibilitato a comunicare o dare il consenso ;
- è istituzionalizzato;
- ha effettuato terapia antivirale nelle due settimane precedenti la data di inizio sintomi;
- ha effettuato il tampone più di 7 giorni dopo l'inizio dei sintomi di SARI;
- ha un test positivo per influenza effettuato precedentemente nella stessa stagione.

8.1.4 Esposizione (vaccinazione)

Un soggetto è definito vaccinato contro l'influenza stagionale se ha ricevuto il vaccino antinfluenzale per la stagione in corso, almeno 14 giorni prima la data inizio sintomi.

Per definire un soggetto vaccinato contro l'influenza stagionale è stato molto importante conoscere la data di inizio dei sintomi, la data di somministrazione del vaccino e la data di ricovero, il tipo di vaccino e il nome del prodotto commerciale. Se i pazienti ospedalizzati e/o i familiari non sono in grado di fornire le informazioni richieste è stato necessario recuperare tale informazione dall'anagrafe vaccinale o dal medico di medicina generale (MMG) del paziente.

8.1.5 Fattori di confondimento e modificatori di effetto

Patologie croniche di base

Considerato che l'efficacia vaccinale sul campo può essere influenzata dalla presenza di alcune patologie croniche di base, è importante che lo studio caso-controllo ne tenga conto. Pertanto, nei soggetti reclutati nello studio, devono essere raccolte informazioni sulla presenza di:

- Malattie croniche a carico dell'apparato respiratorio⁵
- Malattie dell'apparato cardiovascolare⁶
- Diabete mellito e altre malattie metaboliche
- Malattie renali con insufficienza renale
- Malattie degli organi emopoietici ed emoglobinopatie
- Neoplasie in corso
- Gravi epatopatie e cirrosi epatica
- Malattie congenite ed acquisite che comportino carente produzione di anticorpi
- Immunosoppressione indotta da farmaci o da HIV
- Malattie infiammatorie croniche e sindromi da malassorbimento intestinale
- Patologie associate ad un aumentato rischio di aspirazione delle secrezioni respiratorie
- Obesità con indice di massa corporea (BMI) > 30 e gravi patologie concomitanti
- Anemia, ingrossamento della milza
- Leucemia, linfomi
- Deficienze nutrizionali

- Demenza/ictus
- Malattie reumatiche

La severità delle condizioni di base può essere un importante confondente. Pertanto il grado di severità della malattia cronica è misurato in base al numero di ricoveri causati da tale condizione, nei 12 mesi precedenti lo studio.

Inoltre è stato considerato anche la storia di fumo che è stata classificata come segue: non fumatore, ex-fumatore (ha smesso di fumare almeno 1 anno prima l'arruolamento nello studio), fumatore.

8.1.6 Periodo di studio

Il suddetto studio è stato condotto dal nostro centro per due stagioni influenzali consecutive (2015-2016,2016-2017); in particolare nella stagione influenzale 2015-2016 il periodo di studio è andato dalla settimana 47-2015 alla settimana 15-2016; mentre nella stagione 2016-2017 abbiamo osservato i casi di SARI in pazienti con un età maggiore ai 65 anni dalla settimana 50-2016 (dal 12 dicembre 2015) alla settimana 15-2017 (fino al 16 aprile 2017).

9. TEST DI LABORATORIO

Il personale sanitario coinvolto nello studio, ha effettuato un tampone faringeo o naso-faringeo a tutti i pazienti reclutati. La diagnosi virologica è fortemente condizionata dalla modalità e rapidità di invio al laboratorio del campione raccolto. E' importante, dunque, che il tampone venga conservato in frigorifero o in ambiente refrigerato fino al momento della consegna al Laboratorio.

La conferma di laboratorio è stata effettuata secondo le indicazioni del Centro Nazionale Influenza dell'Istituto Superiore di Sanità.

Gli isolati sono stati sottoposti ad analisi molecolare per i virus influenzali circolanti nella stagione in corso. Su tutti o un sottoinsieme rappresentativo di campioni positivi, è stata effettuata la caratterizzazione genetica e antigenica.

I pazienti sono stati reclutati mediante due metodi:

- ✓ Sistema di sorveglianza sindromica
- ✓ Sorveglianza di laboratorio

Una volta reclutato è stato fatto firmare un consenso informato ed è stato eseguito un tampone faringeo; è stato inoltre somministrato un questionario di tipo anamnestico, in cui vi erano sezioni dedicate ai fattori confondenti (malattie croniche, fumo, ecc)

I campioni respiratori giunti al *Laboratorio di Riferimento Regionale per la diagnosi di Influenza, afferente alla rete Influnet-ISS*, sono stati analizzati tramite test molecolare multiplex **One-step real-time RT-PCR** (*kit multiplex Allplex™ Respiratory Panel Assays, Seegene, Seoul, South Korea*) per il rilevamento dei principali virus, agenti eziologici di **ILI** (*Influenza Like Illness*) e **LRTI** (*Lower Respiratory Tract Infection*).

I campioni di materiale patologico da esaminare variano in relazione alla sintomatologia, alla localizzazione del processo infettivo ed ai particolari quesiti diagnostici.

Per la diagnosi delle infezioni delle basse vie respiratorie le tipologie di campioni principalmente utilizzate provengono da lavaggio bronco alveolare (BAL), ottenuto mediante inserimento in un segmento polmonare di soluzione fisiologica sterile (tramite broncoscopio) e successiva ri-aspirazione della stessa.

Per le infezioni delle alte vie respiratorie il campione di partenza maggiormente utilizzato è rappresentato da essudato, muco o materiale necrotico prelevato mediante tampone dalla superficie della mucosa del distretto naso-faringeo (tampone naso-faringeo) o da quello

faringeo-tonsillare (tampone oro-faringeo).

Il campione biologico, prelevato durante la fase sintomatica acuta, è stato raccolto utilizzando i tamponi (Tamponi floccati con UTM (Copan)); questo kit è costituito dal tampone per il prelievo a livello oro-faringeo e da una provetta contenente una spugnetta imbevuta di adeguato terreno di trasporto utile per preservare la vitalità del virus. Successivamente i campioni vengono diluiti utilizzando soluzione fisiologica (1%), e viene fatta un'aliquota (200 µl) di ciascun campione così allestito che è stato destinato alle analisi di biologia molecolare, mentre la restante parte verrà stoccata a -80°C.

9.1 Estrazione degli acidi nucleici ed amplificazione tramite pcr

L'utilizzo di un estrattore automatico (*NucliSENS® EasyMAG®, Biomérieux, France*) ha permesso l'estrazione contemporanea sia dell'RNA che del DNA contenuti nel campione.

Questo metodo, basato sulla chimica di Boom, utilizza la silice magnetica per estrarre gli acidi nucleici dal campione biologico in esame. In ambiente con forti concentrazioni di sali, gli acidi nucleici legano le particelle di silice costituendo la fase solida di estrazione. Attraverso cicli di lavaggi i componenti diversi dagli acidi nucleici vengono eliminati e al termine dell'estrazione gli acidi nucleici vengono eluiti dalla fase solida. Le 4 fasi del protocollo di estrazione degli acidi nucleici sono (Fig.6):

1. Lisi dell'involucro virale, con la conseguente liberazione degli acidi nucleici contenuti e inattivazione di Rnasi e Dnasi: 500 µl di campione sono stati aggiunti a 1,5 ml di NucliSens Lysis Buffer, una soluzione contenente prevalentemente tiocianato di guanidina (5 mol/l). Successivamente la miscela è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente.
2. Legame alla silice: 100 µl di silice, costituita da biglie magnetiche, sono stati aggiunti a ciascun campione lisato.
3. Lavaggi: sono stati effettuati 4 lavaggi utilizzando tre diversi buffer a composizione non nota.
4. Eluizione: dopo 5 minuti di incubazione a 60°C in 100 µl di buffer di eluizione (a composizione non nota), la silice magnetica è stata eliminata e l'acido nucleico rimasto nel buffer di eluizione trasferito in provette da 1 ml.

L'estratto ottenuto è stato utilizzato direttamente per le analisi molecolari e successivamente conservato a -20°C.

Le fasi 1. e 4. Sono state condotte manualmente e in ambiente protetto (cappa a flusso laminare di classe II), mentre le restanti fasi sono state eseguite in modo automatizzato dallo strumento.

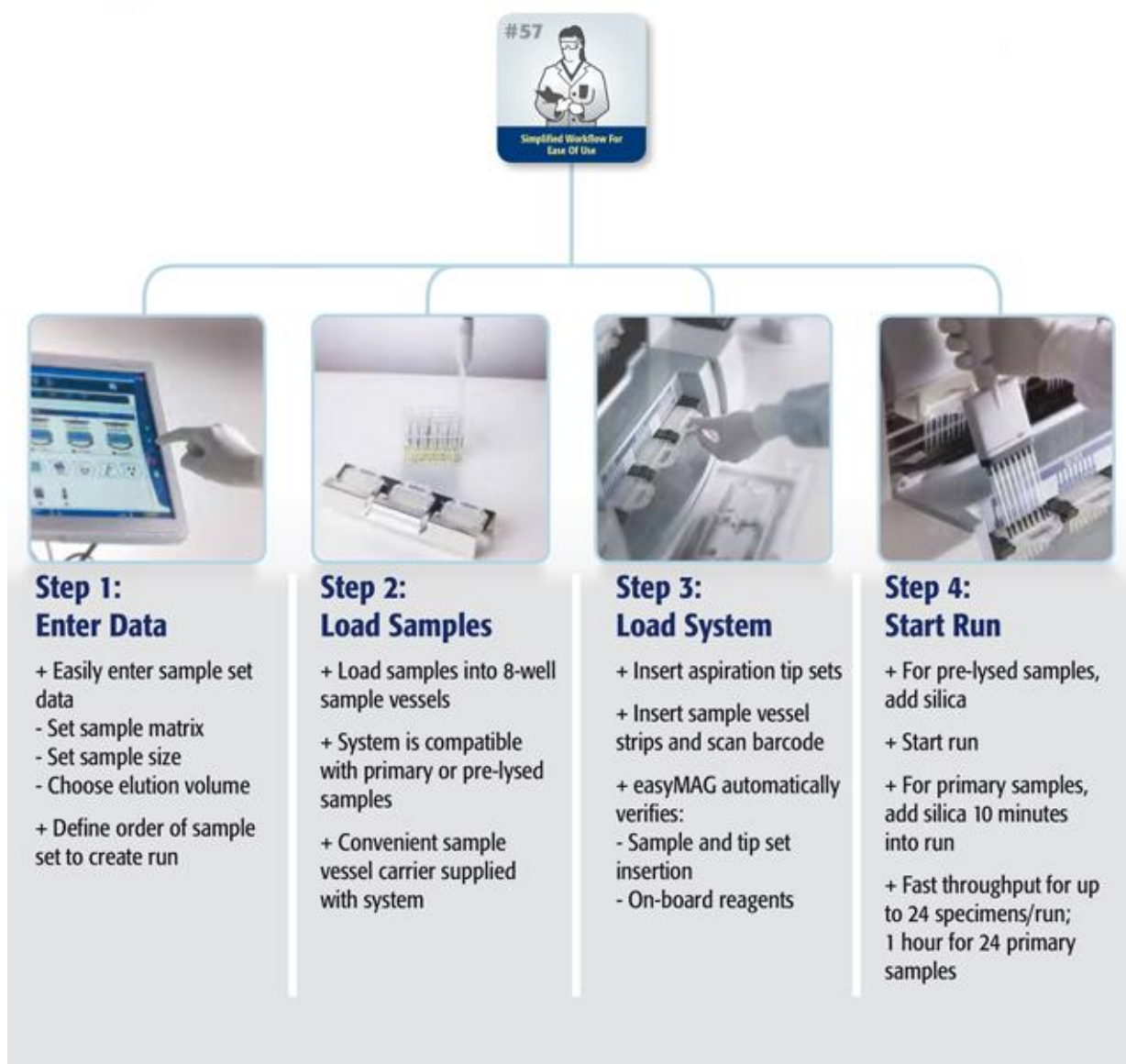


Fig.16 Estrazione acidi nucleici con NucliSENS® EasyMAG®, Biomérieux, France

Tutti i campioni sono stati quindi sottoposti a Real Time PCR utilizzando Allplex™ Respiratory Panel Assays.

Il kit Allplex™ è composto da 4 diversi pannelli che eseguono un esame RT-PCR in un tempo reale a 1 passaggio (One-Step) per la rilevazione e identificazione dei virus da campioni di aspirato rinofaringeo, tampone rinofaringeo e lavaggio broncoalveolare. Sulla base di questa tecnologia il test consente di segnalare il valore individuale di C_t di più patogeni in un singolo canale su uno strumento PCR in tempo reale (CFX96™ Real-time PCR system Bio-Rad).

In generale si tratta di un test qualitativo in vitro per la rilevazione singola o multipla di vari virus; i primer per il virus dell'influenza sono stati progettati in regioni conservate nel gene matrice (M1) per rilevare i vari sottotipi del virus. (compreso il sottotipo dell'influenza A H5N1 causa dell'influenza aviaria ad alta patogenicità e il nuovo virus dell'influenza A sottotipo H1N1 di derivazione suina, rilevato la prima volta nell'aprile 2013).

Panel 1	CE-IVD Marked	Panel 2	CE-IVD Marked
<ul style="list-style-type: none"> - Influenza A virus (Flu A) - Influenza B virus (Flu B) - Respiratory syncytial virus A (RSV A) - Respiratory syncytial virus B (RSV B) - Flu A-H1 - Flu A-H1pdm09 - Flu A-H3 		<ul style="list-style-type: none"> - Adenovirus (AdV) - Enterovirus (HEV) - Parainfluenza virus 1 (PIV 1) - Parainfluenza virus 2 (PIV 2) - Parainfluenza virus 3 (PIV 3) - Parainfluenza virus 4 (PIV 4) - Metapneumovirus (MPV) 	
Panel 3	CE-IVD Marked	Panel 4	CE-IVD Marked
<ul style="list-style-type: none"> - Bocavirus (HBoV) - Rhinovirus (HRV) - Coronavirus NL63 (CoV NL63) - Coronavirus 229E (CoV 229E) - Coronavirus OC43 (CoV OC43) 		<ul style="list-style-type: none"> - <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (MP) - <i>Chlamydia pneumoniae</i> (CP) - <i>Legionella pneumophila</i> (LP) - <i>Haemophilus influenzae</i> (HI) - <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP) - <i>Bordetella pertussis</i> (BP) - <i>Bordetella parapertussis</i> (BPP) 	

Fig.17 Virus e batteri respiratori rilevati con Allplex™ Respiratory Panel Assays.

Lo strumento utilizzato per effettuare la RT-PCR (**CFX96™Real-time PCR system, Bio-Rad**) utilizza uno specifico protocollo per amplificare RNA/DNA virale: l'analisi dura circa 2:08 ore. Dopo avere eseguito il test, appare la scheda di Quantificazione che utilizziamo per confermare i risultati della curva di amplificazione. A questo punto la seduta viene importata nel programma **Seegene Viewer** per l'analisi e l'interpretazione dei risultati .

10. RISULTATI

Durante le due stagioni influenzali in cui è stato condotto lo studio sono stati raccolti un totale di 661 campioni da tutti e tre i centri che vi hanno partecipato; in particolare il nostro centro è stato quello che ha raccolto un numero maggiormente significativo di campioni, per un totale di 457 campioni durante entrambe le stagioni prese in esame (rispettivamente 247 nella stagione 2015/2016 e 210 nella stagione 2016/2017).

Nella stagione influenzale 2015-2016 il livello di incidenza raggiunto è stato piuttosto basso; il picco influenzale si è manifestato dalla settimana 41/2015: settimana in cui la maggior parte dei campioni clinici raccolti sono risultati positivi al virus influenzale di tipo B (57.3%).

Durante la stagione influenzale 2016-2017 la totalità delle SARI confermate in laboratorio è risultata appartenente al sottotipo A/H3N2.

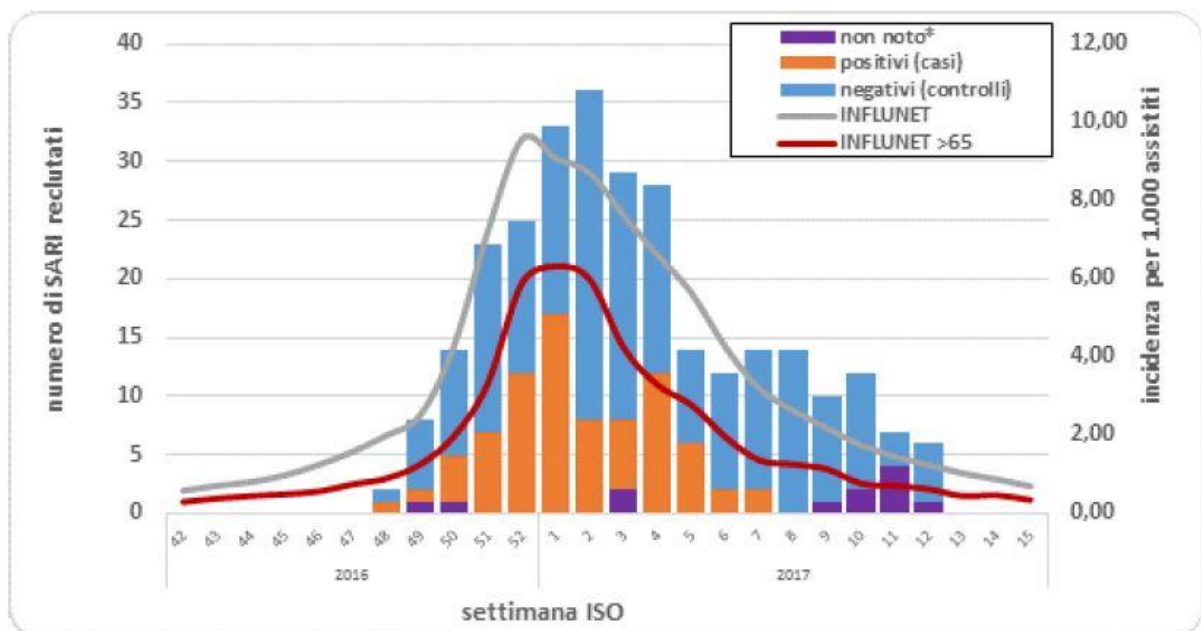
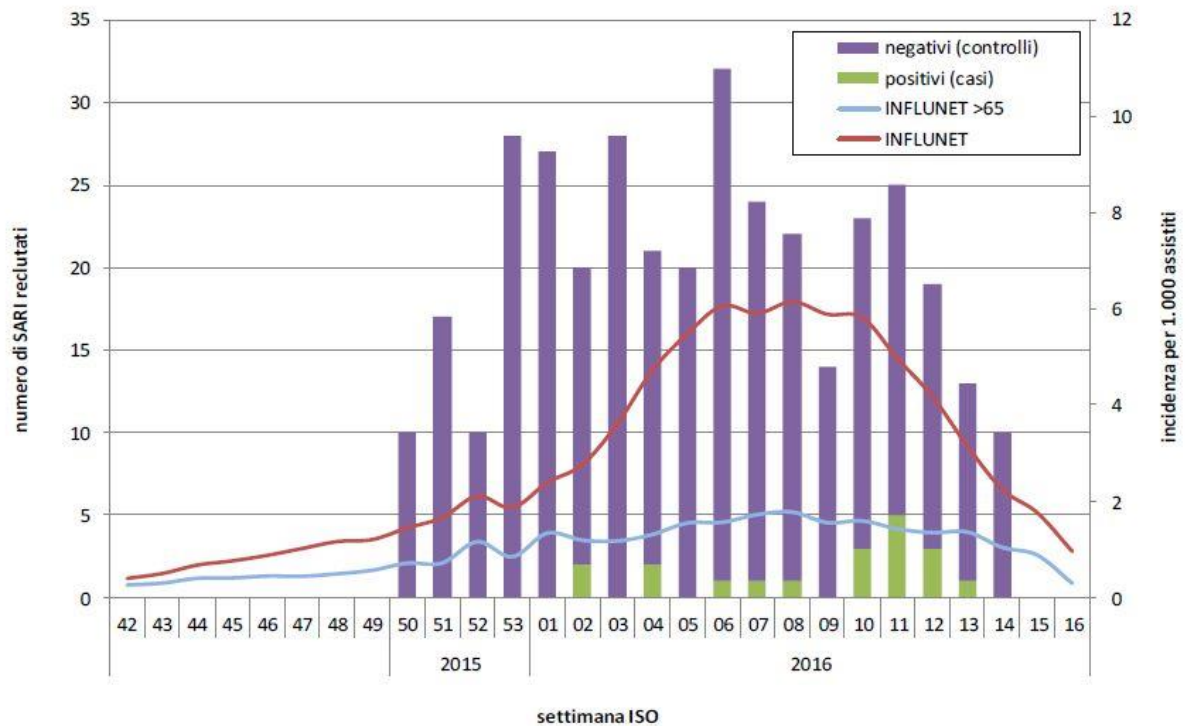


Fig.18 Distribuzione dei casi di SARI reclutati per settimana (fonte IMOVE+) e curva di incidenza casi ILI negli ultrasessantacinquenni (fonte INFLUNET) nelle stagioni influenzali 2015-2016 e 2016-2017

I campioni raccolti dal nostro centro appartenevano a reparti in cui i pazienti presentano diverse co-morbidità, per cui è facile per questi soggetti contrarre il virus influenzale; l'età media è di 76 anni e la maggior parte di essi sono di sesso maschile.

Un dato importante che è stato verificato nei pazienti reclutati per lo studio è stato, ovviamente, lo stato vaccinale (esposizione); i risultati sono mostrati nelle tabelle sottostanti:

STAGIONE 2015-2016

Ospedale	Casi di SARI inclusi nello studio			Totale
	Vaccinati N (%)	Non vaccinati N (%)	Vaccinazione non nota N (%)	
Bari	46 (54,1)	32 (37,6)	7 (8,2)	85
Genova	107 (43,3)	136 (55,1)	4 (1,6)	247
Siena	19 (45,2)	23 (54,8)	-	42
Totale	172	191	11	374

STAGIONE 2016-2017

Centro	Casi di SARI reclutati			Totale
	Vaccinati N (%)	Non vaccinati N (%)	Vaccinazione non nota N	
Genova	110 (52)	99 (47)	1	210
Siena	11 (58)	8 (42)	0	19
Bari	26 (45)	32 (55)	0	58
Totale	147	139	1	287

L' *ODDS RATIO* è pari a 0,84 e l'efficacia vaccinale è pari al 16%, ma i numeri non consentono di raggiungere la significatività statistica (intervallo di confidenza non significativo). Per questo motivo l'efficacia del vaccino non risulta essere soddisfacente.

11. CONCLUSIONI

Il presente studio conferma l'elevato impatto dei virus influenzali nella popolazione, in particolare nei pazienti ospedalizzati ultrasessantacinquenni, che presentano multipli fattori di rischio legati all'età e alle condizioni cliniche; in aggiunta risulta evidente il significativo ruolo giocato dagli altri virus respiratori nell'epidemiologia delle LRTI.

I nostri risultati, in accordo con i dati raccolti nei vari centri reclutati per lo studio I-MOVE+, ci indicano una bassa *effectiveness* del vaccino anti-influenzale, soprattutto nei confronti del virus A(H3N2).

Considerando i pazienti non vaccinati come riferimento, è stata osservata una riduzione delle ospedalizzazioni associate ad influenza nei pazienti vaccinati durante le stagioni influenzali 2015-2016 e 2016-2017. I pazienti vaccinati durante la stagione 2015-2016 hanno beneficiato di un effetto proteggente residuo durante la stagione successiva.

Secondo i dati raccolti dal WHO e illustrati nel report annuale per la stagione 2016-2017, la circolazione del virus influenzale A(H3N2) è risultata predominante in tutto il mondo, con un'elevata diffusione del virus vaccinale A/Hong Kong/4801/2014 nell'emisfero NORD. Le componenti di virus A(H3N2) incluse nel vaccino anti-influenzale nella stagione 2016-2017 sono rimaste invariate nella stagione successiva.

Il mezzo principale per la prevenzione dell'infezione influenzale e delle sue complicanze è la vaccinazione, che è raccomandata per i pazienti con età pari o superiore a 65 anni, soggetti con patologie croniche, donne in gravidanza, medici e personale sanitario ecc.

Per ridurre significativamente la morbosità per influenza e le sue complicanze è necessario quindi raggiungere coperture elevate nei gruppi di popolazione target della vaccinazione, in particolare nei soggetti ad alto rischio di tutte le età.

Le stime di efficacia tempestive dei vaccini antinfluenzali stagionali sono essenziali e vanno perseguite per valutare l'impatto delle strategie vaccinali e per stimolare la ricerca di base nel campo dei vaccini antinfluenzali.

Il nostro centro ha partecipato alla principale esperienza europea di valutazione dell'efficacia sul campo del vaccino antinfluenzale; ma la numerosità modesta dei casi e degli esposti, che hanno risentito della copertura vaccinale (52,6% dato nazionale) e della moderata circolazione di virus influenzali ci dà un intervallo di confidenza ampio.

Sono stati arruolati presso il nostro centro il maggior numero di partecipanti in entrambe le stagioni in cui si è svolto il progetto ed è per questo motivo che il progetto è proseguito durante la stagione influenzale 2017/2018.

12 .BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Fact sheet n° 211; 2003. Disponibile online sul sito <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/print.html>
2. Sito Non farti influenzare: <https://www.nonfartiinfluenzare.it/cont/linfluenza-nellanziano/205/influenza-nell-anziano.asp>
3. Centkowski P, Brydak L, Machala M, Kalinka-Warzocha E, Blasinska- Morawiec m, Federowicz I, Walewski J, Wegrzyn J, Wolowiec D, Lech-Maranda E, Sawczuk-Chabin J, Bilinski P, Warzocha K and for the polish Lymphoma Research Group. Immunogenicity of influenza Vaccination in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma. *Journal of Clinical Immunology*. 2007,27:10875-007-9073-3.
4. Boeckh M, Erard V, Zerr D, Englund J (2005) Emerging viral infections after hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Transplant* 9(Suppl 7):48–54.
5. Renaud C, Campbell AP (2011) Changing epidemiology of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 24(4):333–343
6. Mahony JB (2010) Nucleic acid amplification-based diagnosis of respiratory virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8(11):1273–1292
7. Carman WF, Wallace LA, Walker J, McIntyre S, Noone A, Christie P, Millar J, Douglas JD (2000) Rapid virological surveillance of community influenza infection in general practice. *Bmj* 321(7263):736–737
8. Fiore AE, Shay DK, Haber P, Iskander JK, Uyeki TM, Mootrey G, Bresee JS, Cox NJ; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007. *MMWR Recomm Rep*. 2007 Jul 13;56(RR-6):1-54. PubMed PMID: 17625497.
9. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, Wingard JR, Young JA, Boeckh MJ (2009) Guidelines for preventing infectious complications among

- hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 15(10):1143–1238
10. Vu D, Peck AJ, Nichols WG, Varley C, Englund JA, Corey L, Boeckh M (2007) Safety and tolerability of oseltamivir prophylaxis in hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective case– control study. *Clin Infect Dis* 45(2):187–193
 11. Zaia J, Baden L, Boeckh MJ, Chakrabarti S, Einsele H, Ljungman P, McDonald GB, Hirsch H (2009) Viral disease prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 44(8):471–482
 12. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007, 25:6852-62.
 13. Wiley DC, Skehel JJ. The Structure and function of the hemagglutinin glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:365-394.
 14. Wood JM. Selection of influenza vaccine strains and developing pandemic vaccines. *Vaccine* 2002;20(Suppl 5):B40–4.
 15. de Jong JC, Beyer WEP, Palanche AM, Rimmelzwaan C, Osterhaus ADME. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A/H3N2 virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response of this strain in the elderly. *J Med Virol*. 2000;61:94-99.
 16. Ansaldi F, Bacilieri S, Banfi F, Durando P, Sticchi L, Icardi G, Gasparini R. Neutralizing and hemagglutination-inhibiting activities of antibodies elicited by the 2004-2005 influenza vaccine against drifted viruses. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:162-4.
 17. Kojimahara N, Maeda A, Kase T, Yamaguchi N. Cross-reactivity of influenza A (H3N2) hemagglutination-inhibition antibodies induced by an inactivated influenza vaccine. *Vaccine*. 2006;24:5966-9.
 18. Del Giudice G, Hilbert AK, Bugarini R, Minutello A, Popova O, Toneatto D, Schoendorf I, Borkowski A, Rappuoli R, Podda A. An MF59™-adjuvanted inactivated influenza vaccine containing A/Panama/1999 (H3N2) induced broader serological protection against heterovariant influenza virus strain A/Fujian/2002 than a subunit and a split influenza vaccine. *Vaccine*. 2006;24:3063-5.

19. Ansaldi F, Canepa P, Ceravolo A, Valle L, de Florentiis D, Oomen R, Vogel FR, Denis M, Samson SI, Icardi G. Intanza(®) 15 mcg intradermal influenza vaccine elicits cross-reactive antibody responses against heterologous A(H3N2) influenza viruses. *Vaccine*. 2012 Apr 16;30(18):2908-13. Epub 2012
20. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2571_allegato.pdf
21. Orsi A, Ansaldi F, de Florentiis D, Ceravolo A, Parodi V, Canepa P, Coppelli M, Icardi G, Durando P. Cross-protection against drifted influenza viruses: options offered by adjuvanted and intradermal vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Mar;9(3):582-90. Epub 2013 Jan 7.
22. Ken M, Kunisaki, M.D., Edward N. Janoff, M.D. (2009) Influenza in Immunosuppressed Populations: a review of infection Frequency, Morbidity, Mortality and Vaccine response. *Lancet Infect Dis*. 2009 August; 9 (8):493-504.
23. Kilbourne ED. Influenza. New York, Plenum Medical Book Company, 1987.
24. Ruigrok RWH. Structure of Influenza A, B and C Viruses in: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. Textbook of influenza. Oxford: Blackwell Science 1998; 29-39.
25. Colman PM. Structure and Function of the Neuraminidase in: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. Textbook of influenza. Oxford: Blackwell Science 1998; 65-71.
26. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:365-94.
27. Sternhauer DA, Wharton SA. Structure and Function of the Haemagglutinin in: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. Textbook of influenza. Oxford: Blackwell Science 1998; 55-61.
28. Hay AJ. The Virus Genome and its Replication in: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. Textbook of influenza. Oxford: Blackwell Science 1998; 43-51.
29. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication in: Knipe DM, Howley PM, editors. Field Virology: Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1647-1689.

30. McCullers JA, Wang GC, He S, Webster RG. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature *J Virol.* 1999;73:7343-8.
31. Gammelin M, Altmüller A, Reinhardt U, Mandler J, Harley VR, Hudson PJ, et al. Phylogenetics analysis of nucleoprotein suggests that human influenza A virus emerged from 19th – century avian ancestor. *Mol Biol Evol* 1990;7:194-200.
32. Halvorson D, Karunakaran D, Senne D, Kelleher C, Bailey C, Abraham A, Hinshaw V, Newman J. Epizootiology of avian influenza simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Dis.* 1983;27:77-85.
33. Alexander DJ, Parson G, Manvell RJ. Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chicken, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol* 1986; 15:647-62.
34. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology.* 1978;84:268-78.
35. Webster RG, Morita M, Pridgen C, Tumova B. Ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks: characterization of a new group of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 1976;32:217-25.
36. Süss J, Schäfer J, Sinnecker H, Webster RG. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Arch Virol.* 1994;135:101-14.
37. Scholtissek C, Bürger H, Bachmann PA, Hannoun C. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology.* 1983;129:521-3.
38. Hinshaw VS, Bean WJ, Geraci J, Fiorelli P, Early G, Webster RG. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol.* 1986;58:655-6.
39. Guo Y, Wang M, Kawaoka Y, Gorman O, Ito T, Saito T, Webster RG. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology.* 1992;188:245-55.

40. Scholtissek C, Bürger H, Kistner O, Shortridge KF. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*. 1985;147:287-94.
41. Scholtissek C. Pigs as “mixing vessels” for the creation of new pandemic influenza A viruses. *Med Principles Pract*. 1990; 2:65-71.
42. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1651-6.
43. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*. 1989;63:4603-8.
44. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med*. 2005;352(4):333-40.
45. <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-people.htm>
46. Wang H, Feng Z, Shu Y, et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet*. 2008; 371(9622):1427-34.)
47. <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h7n9-virus.htm>
48. <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/h3n2v-cases.htm>
49. Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol*. 1983;48:52-60.
50. Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*. 1981;289:373-8.
51. Both GW, Shi CH, Kilbourne ED. Hemagglutinin of swine influenza virus: a single amino acid change pleiotropically affects viral antigenicity and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:6996-7000.
52. Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*. 1982;31:417-27.

53. Yewdell JW, Webster RG, Gerhard WU. Antigenic variation in three distinct determinants of an influenza type A haemagglutinin molecule. *Nature*. 1979;279:246-8.
54. Wang ML, Skehel JJ, Wiley DC. Comparative analyses of the specificities of anti-influenza hemagglutinin antibodies in human sera. *J Virol*. 1986;57:124-8.
55. Shaw MW, Xu X, Li Y, Normand S, Ueki RT, Kunimoto GY, Hall H, Klimov A, Cox NJ, Subbarao K. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. *Virology*. 2002;303:1-8.
56. Brankston G, Gitterman L, Hirji Z, Lemieux C, Gardam M. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:257-65.
57. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxovirus in: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field Virology*: Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1691-1740.
58. Murphy BR, Chalhub EG, Nusinoff SR, Kasel J, Chanock RM. Temperature-sensitive mutants of influenza virus. 3. Further characterization of the ts-1(E) influenza A recombinant (H3N2) virus in man. *J Infect Dis*. 1973;128:479-87.
59. Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM, Meagher MP. Viral shedding patterns of children with influenza B infection. *J Infect Dis*. 1979;140:610-3.
60. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxovirus in: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field Virology*: Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1691-1740.
61. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *Am J Med*. 2008;121:258-64.
62. Mandell LA. Update on community-acquired pneumonia. New pathogens and new concepts in treatment. *Postgrad Med*. 2005;118:35-6,41-6.
63. Schwarzmans SW, Adler JL, Sullivan RJ Jr, Marine WM. Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med*. 1971;127:1037-41.

64. Lewis M, Kallenbach J, Ruff P, Zaltzman M, Abramowitz J, Zwi S. Invasive pulmonary aspergillosis complicating influenza A pneumonia in a previously healthy patient. *Chest*. 1985;87:691-3.
65. Miyashita N, Matsushima T. Chlamydia pneumoniae infection during an influenza virus A epidemic: preliminary report. *J Med Microbiol*. 2000;49:391-2.
66. Rohde G, Wiethage A, Borg I, Kauth M, Bauer TT, Gillissen A, Bufe A, Schultze-Werninghaus G. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax*. 2003;58:37-42.
67. Lin CY, Kuo YC, Liu WT, Lin CC. Immunomodulation of influenza virus infection in the precipitating asthma attack. *Chest*. 1988;93:1234-8.
68. Glezen WP, Decker M, Perrotta DM. Survey of underlying conditions of persons hospitalized with acute respiratory disease during influenza epidemics in Houston, 1978-1981. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:550-5.
69. Hak E, Wei F, Nordin J, Mullooly J, Poblete S, Nichol KL. Development and validation of a clinical prediction rule for hospitalization due to pneumonia or influenza or death during influenza epidemics among community-dwelling elderly persons. *J Infect Dis*. 2004;189:450-8
70. Neuzil KM, Reed GW, Mitchel EF, Simonsen L, Griffin MR. Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalizations in pregnant women. *Am J Epidemiol*. 1998;148:1094-102.
71. Fine AD, Bridges CB, De Guzman AM, Glover L, Zeller B, Wong SJ, Baker I, Regnery H, Fukuda K. Influenza A among patients with human immunodeficiency virus: an outbreak of infection at a residential facility in New York City. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1784-91.
72. Vilchez RA, McCurry K, Dauber J, Lacono A, Griffith B, Fung J, Kusne S. Influenza virus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2002;2:287-91.

73. Kim YJ, Boeckh M, Englund JA (2007) Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Semin Respir Crit Care Med* 28(2):222–242
74. Ljungman P (2001) Respiratory virus infections in stem cell transplant patients: the European experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 7(Suppl):5S–7S
75. Bowden RA (1997) Respiratory virus infections after marrow transplant: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *Am J Med* 102(3A):27–30, discussion 42–23
76. Martino R, Porras RP, Rabella N, Williams JV, Ramila E, Margall N, Labeaga R, Crowe JE Jr, Coll P, Sierra J (2005) Prospective study of the incidence, clinical features, and outcome of symptomatic upper and lower respiratory tract infections by respiratory viruses in adult recipients of hematopoietic stem cell transplants for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 11(10):781–796
77. Boeckh M (2008) The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Br J Haematol* 143(4):455–467
78. Ebbert JO, Limper AH (2005) Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration* 72(3):263–269
79. Kunisaki KM, Janoff EN. Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis* 2009;9:493–504.
80. Kim YJ, Boeckh M, Englund JA. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Semin Respir Crit Care Med* 2007;28:222–42.
81. Chemaly RF, Ghosh S, Bodey GP, Rohatgi N, Safdar A, Keating MJ, Champlin RE, Aguilera EA, Tarrand JJ, Raad II. Respiratory viral infections in adults with hematologic malignancies and human stem cell transplantation recipients: a retrospective study at a major cancer center. *Medicine (Baltimore)* 2006;85:278–87.
82. Ljungman P. Respiratory virus infection in stem cell transplant recipients: the European experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7(Suppl.):5S–7S.

83. Bowden RA (1997) Respiratory virus infections after marrow transplant: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *AmJ Med* 102(3A):27–30, discussion 42–23
84. Renaud C, Campbell AP (2011) Changing epidemiology of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 24(4):333–343
85. Ebbert JO, Limper AH (2005) Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration* 72(3):263–269
86. Cortez KJ, Erdman DD, Peret TC, Gill VJ, Childs R, Barrett AJ, Bennett JE. Outbreak of human parainfluenza virus 3 infections in a hematopoietic stem cell transplant population. *J Infect Dis*. 2001 Nov 1;184(9):1093-7.
87. Nichols WG, Erdman DD, Han A, Zukerman C, Corey L, Boeckh M. Prolonged outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in a stem cell transplant outpatient department: insights from molecular epidemiologic analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004 Jan;10(1):58-64.
88. de Jong JC, Beyer WEP, Palanche AM, Rimmelzwaan C, Osterhaus ADME. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A/H3N2 virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response of this strain in the elderly. *J Med Virol*. 2000;61:94-99.
89. Zambon M. Laboratory diagnosis of influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. *Textbook of influenza*. Oxford: Blackwell Science 1998; 291-313.
90. Playford EG, Dwyer DE. Laboratory diagnosis of influenza virus infection. *Pathology*. 2002;34:115-25.
91. Julkunen I, Hovi T, Seppälä I, Mäkelä O. Immunoglobulin G subclass antibody responses in influenza A and parainfluenza type 1 virus infections. *Clin Exp Immunol*. 1985;60:130-8.
92. Dwyer DE, Smith DW, Catton MG, Barr IG. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. *Med J Aust*. 2006;185:S48-53.
93. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003;362:1733-45.
94. Playford EG, Dwyer DE. Laboratory diagnosis of influenza virus infection. *Pathology*. 2002;34:115-25.

95. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis.* 2006;194:S98-110.
96. Pachucki CT. Rapid Tests for Influenza. *Curr Infect Dis Rep.* 2005;7:187-192.
97. Spada B, Biehler K, Chegas P, Kaye J, Riepenhoff-Talty M. Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and children. *J Virol Methods.* 1991;33:305-10.
98. Ellis JS, Fleming DM, Zambon MC. Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2076-82.
99. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1552-8.
100. Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol.* 2001;39:134-8.
101. <http://www.who.int/topics/influenza/en/>
102. <http://www.epicentro.iss.it/problemi/influenza/influenza.asp>
103. Ansaldi F, Orsi A, Altomonte F, Bertone G, Parodi V, Carloni R, Moscatelli P, Pasero E, Oreste P, Icardi G. Emergency department syndromic surveillance system for early detection of 5 syndromes: a pilot project in a reference teaching hospital in Genoa, Italy. *J Prev Med Hyg.* 2008 Dec;49(4):131-5. PubMed PMID:19350960.
104. Ansaldi F, Orsi A, Altomonte F, Bertone G, Parodi V, Carloni R, Moscatelli P, Pasero E, Comaschi M, Oreste P, Orengo G, Durando P, Icardi G. Syndrome surveillance and molecular epidemiology for early detection and tracing of an outbreak of measles in Liguria, Italy. *J Med Virol.* 2009 Oct;81(10):1807-13.
105. Nichol KL, Margolis KL, Wouremna J, von Sternberg T. Effectiveness of influenza vaccine in the elderly. *Gerontology.* 1996;42:274-9.

106. Nichol KL, Goodman M. Cost effectiveness of influenza vaccination for healthy persons between ages 65 and 74 years. *Vaccine*. 2002;20 Suppl 2:S21-4.
107. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003;362:1733-45.
108. Belshe RB. Influenza prevention and treatment: current practices and new horizons. *Ann Intern Med*. 1999;13:621-4.
109. Nichol KL, Mendelman PM, Mallon KP, Jackson LA, Gorse GJ, Belshe RB, Glezen WP, Wittes J. Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999;282:137-44.
110. Piedra PA, Gaglani MJ, Kozinetz CA, Herschler G, Riggs M, Griffith M, Fewlass C, Watts M, Hessel C, Cordova J, Glezen WP. Herd immunity in adults against influenza-related illnesses with use of the trivalent-live attenuated influenza vaccine (CAIV-T) in children. *Vaccine*. 2005;23:1540-8.
111. Piedra PA, Gaglani MJ, Riggs M, Herschler G, Fewlass C, Watts M, Kozinetz C, Hessel C, Glezen WP. Live attenuated influenza vaccine, trivalent, is safe in healthy children 18 months to 4 years, 5 to 9 years, and 10 to 18 years of age in a community-based, nonrandomized, open-label trial. *Pediatrics*. 2005;116:e397-407.
112. Boyce TG, Gruber WC, Coleman-Dockery SD, Sannella EC, Reed GW, Wolff M, Wright PF. Mucosal immune response to trivalent live attenuated intranasal influenza vaccine in children. *Vaccine*. 1999;18:82-8.
113. Ramon G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull Soc Centr Med Vet* 1925; 101:227-34.
114. Ramon G. Procédes pour accroître la production des antitoxins. *Ann Inst Pasteur* 1926; 40:1-10.
115. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis*. 1980;2:370-83.
116. Allison AC, Byars NE. Adjuvant formulations and their mode of action. *Semin Immunol*. 1990;2:369-74.

117. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today*. 1993;14:281-4.
118. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 1993;11:293-306.
119. Nicklas W. Aluminum salts. *Res Immunol*. 1992;143:489-94.
120. Shirodkar S, Hutchinson RL, Perry DL, White JL, Hem SL. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. *Pharm Res*. 1990;7:1282-8.
121. Gupta RK, Rost BE, Relyveld E and Siber GR. Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. In: *Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach* (Eds Powell MF and Newman MJ). Plenum Publishing Corporation, New York, 1995;229-248.
122. Freund J. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc*. 1956;7:130-48.
123. Ott G, Radhakrishnan R, Fang JH, Hora M. The adjuvant MF59: A 10-year perspective. In: O'Hagan DT, editor. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 42: *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, Totowa, NJ:Humana Press, Inc, 2000;211–228.
124. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine*. 2001;19:2673-80.
125. Baldo V, Baldovin T, Floreani A, Carraro AM, Trivello R; Family Medicine Group of Pianiga. MF59-adjuvanted influenza vaccine confers superior immunogenicity in adult subjects (18-60 years of age) with chronic diseases who are at risk of post-influenza complications. *Vaccine*. 2007 May;25(20):3955-61.
126. Durando P, Fenoglio D, Boschini A, Ansaldi F, Icardi G, Sticchi L, Renzoni A, Fabbri P, Ferrera A, Parodi A, Bruzzone B, Gabutti G, Podda A, Del Giudice G, Fragapane E, Indiveri F, Crovari P, Gasparini R. Safety and immunogenicity of two influenza virus subunit vaccines, with or without MF59 adjuvant, administered to

- human immunodeficiency virus type 1-seropositive and -seronegative adults. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(2):253-9.
127. Alving CR. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiology.* 1993;187:430-46.
 128. Ambrosch F, Wiedermann G, Jonas S, Althaus B, Finkel B, Glück R, Herzog C. Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine. *Vaccine.* 1997;15:1209-13.
 1. Durando P, Iudici R, Alicino C, Alberti M, de Florentis D, Ansaldi F, et al. Adjuvants and alternative routes of administration towards the development of the ideal influenza vaccine. *Hum Vaccin* 2011; 7(Suppl):2940; PMID:21245655; <http://dx.doi.org/10.4161/hv.7.0.14560>.
 129. Lambert PH, Laurent PE. Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine* 2008; 26:3197-208.
 130. Ansaldi F, Durando P, Icardi G. Intradermal influenza vaccine and new devices: a promising chance for vaccine improvement. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Mar;11(3):415-27.
 131. Holland D, Booy R, De Looze F, Eizenberg P, McDonald J, Karrasch J, et al. Intradermal influenza vaccine administered using a new microinjection system produces superior immunogenicity in elderly adults: a randomized controlled trial. *J Infect Dis* 2008; 198:650-8; PMID:18652550; <http://dx.doi.org/10.1086/590434>.
 132. Arnou R, Icardi G, De Decker M, Ambrozaitis A, Kazek MP, Weber F, et al. Intradermal influenza vaccine for older adults: a randomized controlled multicenter phase III study. *Vaccine* 2009; 27:7304-12; PMID:19849996.
 133. Liard C, Munier S, Joulin-Giet A, Bonduelle O, Hadam S, Duffy D, Vogt A, Verrier B, Combadière B. Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J Invest Dermatol.* 2012 Mar;132(3 Pt 1):615-25.
 134. Ministero della Salute. Vaccinazione antinfluenzale - Coperture vaccinali medie. 2016. http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_8_3_1.jsp?lingua=italiano&id=19
 135. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus – update March 2014. Available at

http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/index.html

136. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/
137. Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, Fukuda K, Cox NJ, Katz JM. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. J Clin Microbiol.1999;37:937-43.